Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Rattenleber-Chromatin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaften

eingereicht
dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität zu Marburg

von
Karl Hartmut Richter
aus Kleinmachnow

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck E. Symon · 355 Marburg/Lahn · Friedrichstr. 3

Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Rattenleber-Chromatin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaften

eingereicht
dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität zu Marburg

von
Karl Hartmut Richter
aus Kleinmachnow

Marburg/Lahn 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Chemie
der Universität Marburg am: 11. 10. 1972
Tag der mündlichen Prüfung am: 1.11.72
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. Dehnicke
Referent: Prof. Dr. Karlson
Correferent: Prof. Dr. Kindl

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	EINLEITUNG	7
II	MATERIAL und METHODEN	17
	1. Allgemeine Bestimmungsmethoden	17
	2. Freie Desoxyribonucleinsäure	17
	1. Isolierung von Zellkernen	17
	2. Präparation von Chromatin	18
	3. Gewinnung des Ausgangsmaterials	18
	4. Titration mit Poly-Lysin	19
	5. Pronasebehandlung	19
	6. Nucleaseverdauung	19
	7. Reinigung mit Hydroxyapatit	20
	8. Sucrosegradientenzentrifugation	20
	9. Cäsiumchlorid-Gleichgewichtszentrifugation	21
	10. Renaturierungskinetik	21
	11. Radioaktive Markierung von RNA	21
	12. Transcriptionsstudien	22
	3. Chromosomale Nicht-Histon Proteine	22
	1. Isolierung der chromosomalen Proteine	22
	2. Gewinnung von chromosomalen Nicht-Histon Proteinen	23
	3. Behandlung mit RNase	24
	4. Thiolgehalt	24
	5. Dinitrophenylierung	24
	6. Einbau radioaktiver Aminosäure	25
	7. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
	8. Alkalische Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Harnstoff	26
	9. Rekombination und Transcription	26
III	ERGEBNISSE	27
	1. Freie Desoxyribonucleinsäure	27
	1. Titration mit Poly-Lysin	28
	2. Nucleaseverdauung	29
	3. Molekulargewichtsbestimmung	29
	4. Schwebedichte	31
	5. Renaturierungskinetik	31
	6. Schnellmarkierbare RNA	32
	7. Matrizenaktivität verschiedener DNA-Arten	33
	2. Nicht-Histon Proteine	34
	1.1. Präparation der Nicht-Histon Proteine	34
	1.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
	2. Dinitrophenylierung	36

3. Behandlung mit RNase 37
4.1. Nicht-Histon Proteine verschiedener Organe 39
4.2. Vergleichende Polyacrylamid-Gelelektrophoresen 40
5. Thiol- und Phosphatgehalt 42
6. Relative Umsatzrate 44
7. Transcription 45

IV DISKUSSION 46
1. Freie Desoxyribonucleinsäure 46
2. Nicht-Histon Proteine 52

V. ZUSAMMENFASSUNG 58
1. Freie Desoxyribonucleinsäure 58
2. Nicht-Histon Proteine 59

VI LITERATURVERZEICHNIS 61

ERLÄUTERUNG DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
$c_o t$	Produkt aus Nukleotid-Anfangskonzentration und Zeit
cpm	gezählte Impulse pro Minute
cRNA	chromosomale RNA
CTP	Cytidintriphosphat
DNase	Desoxyribonuclease aus Rinderpankreas (E.C.3.1.4.5)
DNFB	Dinitrofluorbenzol
DRNP	Desoxyribonucleoprotein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E260/280	Quotient der Extinktionen bei den angegebenen Wellenlängen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GTP	Guanosintriphosphat
g, g_{max}	Erdbeschleunigung: mittlere, maximale
h	Stunde
i.p.	intra peritoneal
$\overline{MG}$	mittleres Molekulargewicht
min	Minute
mRNA	Messenger(Matrizen-)-RNA
NHP	chromosomale Nicht-Histon Proteine
O.D.	optische Dichte
$\overline{P}$	mittlerer Polymerisationsgrad
PCA	Perchlorsäure
Polymerase	DNS-abhängige RNS-Polymerase
RNase	Ribonuclease aus Pankreas (E.C. 2.7.7.16)
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
S	Sedimentationskonstante
SDS	Natriumlaurylsulfat=Natriumdodecylsulfat
SH	Sulfhydrylgruppe=Thiolgruppe
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolettes Licht

I. EINLEITUNG

Die lebende Zelle ist ein sehr komplexes organisches System, welches sich nur selbst erhalten kann, wenn seine inneren Bedingungen möglichst konstant bleiben. Es muß deshalb Mechanismen geben, die auf äußere Einflüsse reagieren mit dem Ziel, Änderungen des inneren Milieus entgegenzuwirken. Bei vielzelligen Organismen ergibt sich darüber hinaus das Erfordernis eines Regulationsmechanismus, der ein sinnvolles Zusammenwirken der verschiedenen Gewebe gewährleistet.

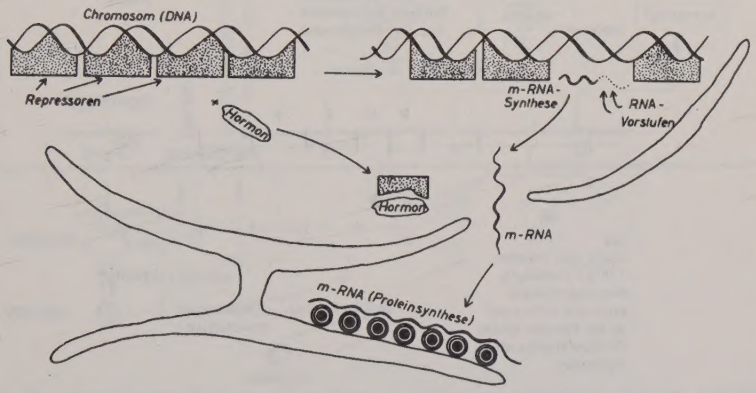


Abb. 1 Schema der Hormonwirkung durch Enzyminduktion. Nach Ablösung des Repressors durch das Hormon ist die Neusynthese von mRNA möglich (nach KARLSON (9))

Man unterscheidet hauptsächlich die Steuerung durch das Nervernsystem und solche hormoneller Art (1). Bei der hormonalen Regulation wird von der Hormondrüse ein chemischer Stoff, das Hormon, produziert, welches durch den Blutstrom im gesamten Organismus verteilt wird und an seinen Wirkorten die ausgleichenden Reaktionen auslöst. Der Mechanismus der Hormonwirkung ist in den letzten Jahren intensiv studiert worden. Neben der Wirkung über das Adenylat-Cyklase-System (2.3.4) ist hier vor allem die Wirkung auf den Zellkern zu

nennen; man beobachtet hierbei eine gesteigerte Synthese von Enzymprotein (5-8), der eine Neubildung von Messenger-RNA (mRNA) vorausgeht (Abb.1) (10-14). Die vermehrte Synthese der mRNA könnte entweder auf die Verfügbarkeit vorher nicht transcribierter DNA, z.B. durch Entfernung von hemmenden Faktoren (15.16) oder auf spezifische Stimulierung der Transcription (17) zurückzuführen zu sein.

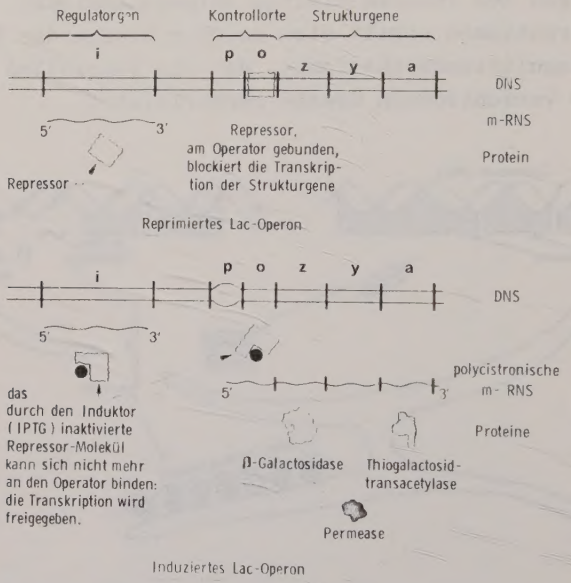


Abb. 2 Das Lac Operon (nach KNIPPERS (18))

Beide Möglichkeiten derartiger Regelvorgänge wurden in Bakteriensystemen gefunden. Zum Beispiel wird die Transcription des Lactose-Operons (Abb. 2) durch Bindung eines Repressors (19. 20), der von einem Regulatorgen codiert wird, an den Operator gehemmt. Durch Anlagerung von Lactose an das Repressorprotein wird die Ablesbarkeit des Genoms wiederhergestellt. Man findet auch das gegenteilige Beispiel, etwa beim Tryptophan-Operon, wo eine Transcription erst beim Absinken der Aminosäurekonzentration einsetzt, weil anscheinend der entsprechende Repressor

nur zusammen mit der Aminosäure an den Operator binden kann (18.21). Eine Induktionswirkung wird am Beispiel vom Arabinose-C Gen deutlich (22). Das hierdurch codierte Protein ist in Abwesenheit von Arabinose als Repressor, in Gegenwart von Arabinose als Induktor wirksam (Abb. 3). Weitere Beispiele für eine positive Kontrolle wurden bei dem Rhamnose-Operon (23) und dem Maltose-Operon (24) gefunden.

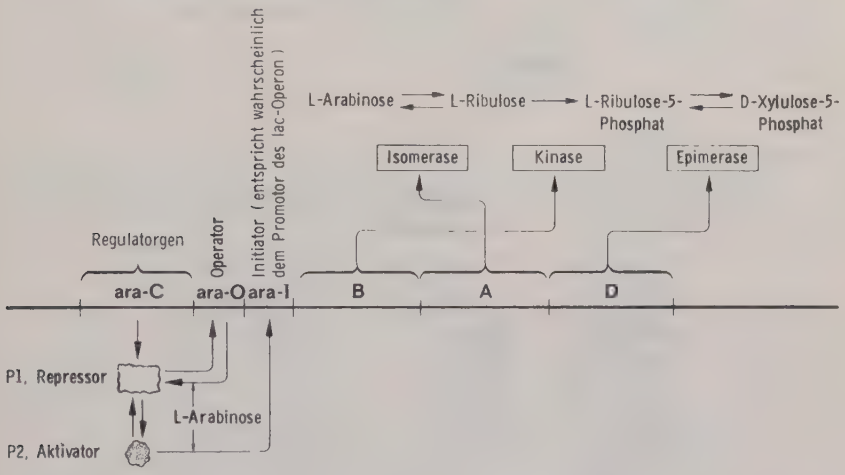


Abb. 3 Positive Kontrolle des Arabinoseoperons (nach KNIPPERS 18)

Es liegt nahe, die bei Bakterien gewonnenen Erkenntnisse auf höhere Organismen zu übertragen und dem Hormon die Wirkung eines Induktors zuzuschreiben. Zwar scheint der Operon-Mechanismus bei Eukarionten nicht vorherrschend zu sein; so wird zum Beispiel die Gruppe von Enzymen, die zur Histidinsynthese beitragen, in Salmonella (Prokaryont) von einem Operon codiert, dagegen sind bei Neurospora crassa (Eukaryont) die Histidin-Gene auf vier verschiedene Chromosomen verteilt(25). Man kann aber wohl mit einigem Recht annehmen, daß der bei Einzellern entwickelte Mechanismus bei der Evolution der Metazoen im Prinzip beibehalten wurde. Das Prinzip kann darin

gesehen werden, daß ein bestimmter DNA-Abschnitt normalerweise durch Protein - Repressoren genannt - blockiert ist und die Transcription erst durch ein bestimmtes Signal (z.B. durch das Hormon) freigegeben wird (Abb. 4) (11.21.26.27).

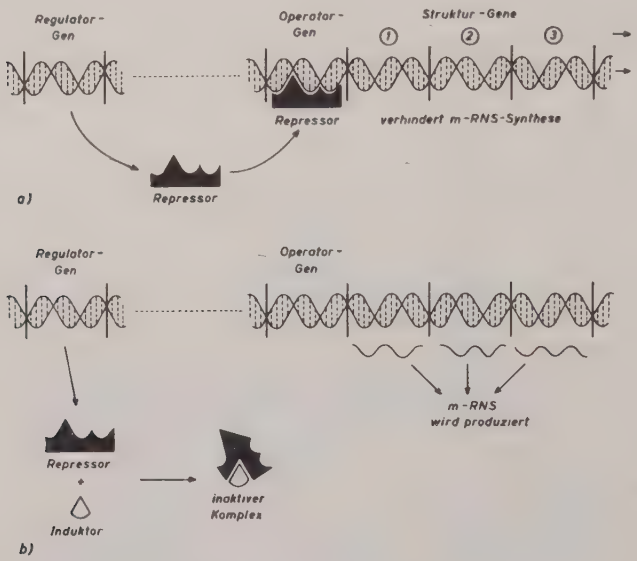


Abb. 4 Schema der Regulation der Genaktivität von JACOB und MONOD (nach KARLSON 9)

Die Frage nach der Natur möglicher Repressoren führt so zur Untersuchung der genetischen Funktionseinheit - dem Chromatin. Der Name Chromatin ist historisch begründet und bezeichnete den Anteil der Zellkerne, der mit basischen Farbstoffen angefärbt werden kann (28). Darüber hinaus ist es eine Bezeichnung für den funktionellen Apparat des Genoms. Das Chromatin besteht aus Protein und DNA im Verhältnis von etwa 2:1 und enthält ferner etwas RNA (29). Die genaue Zusammensetzung hängt ab von der Spezies (30), dem Entwicklungszustand (31), dem Gewebe (29.30) und der funktionellen Aktivität (32.33). Die RNA des Zellkerns setzt sich zusammen aus der Transfer-RNA (t-RNA), der ribosomalen RNA (rRNA), einer besonders

hochmolekularen RNA-Fraktion mit Sedimentationskonstanten über 100 S (34) und nach neueren Untersuchungen (35.36) anscheinend auch zu einem geringen Teil aus der chromosomalen RNA (cRNA).

Die Existenz der cRNA ist umstritten. Viele Arbeiten (Literatur in 35.36) beschäftigen sich mit dieser niedermolekularen RNA (etwa 40 Nukleotide), die an Protein gebunden ist, einen hohen Anteil (ca. 10 Mol %) an Dihydrouridin besitzt und außerordentlich stark mit DNA hybridisiert (ca. 5%). Hieraus und aus anderen Experimenten wurde eine mögliche regulative Funktion der cRNA abgeleitet. Diese Ansicht ist nicht unwidersprochen geblieben (37.38).

Die DNA ist chemisch gut charakterisiert (39-41), und auch der räumliche Aufbau ist in vielen Arbeiten beschrieben worden (41-44) (Abb. 5). Eine Unterteilung der DNS jedoch in verschie-

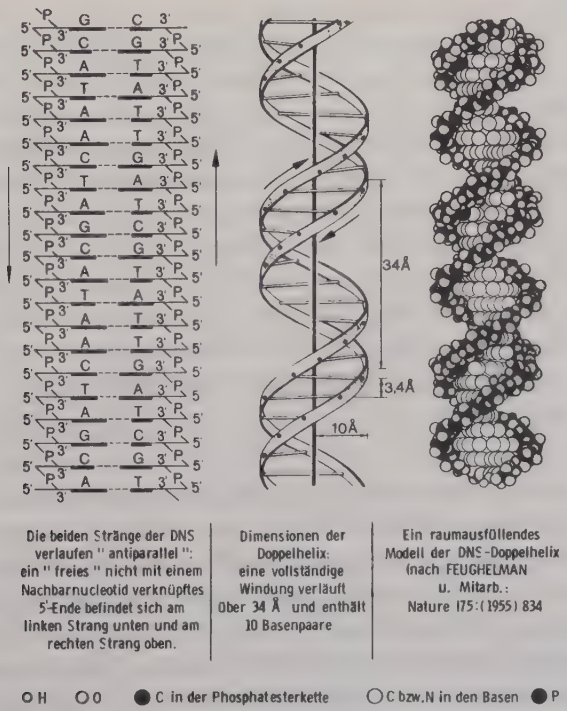


Abb. 5 Struktur der DNA - die Doppelhelix (nach KNIPPERS (18))

denartige Fraktionen, möglicherweise funktionell unterschiedliche DNS, stieß auf große Schwierigkeiten. Hier haben BRITTEN und KOHNE (45) wertvolle Beiträge geleistet. Es wurde von ihnen festgestellt, daß ein erheblicher Teil (ca. 1/3) der DNA-Sequenzen in höheren Organismen in der gleichen Form viele tausend Mal im Denom wiederholt vorkommen. Aus vergleichenden Untersuchungen von sich ähnelnden Proteinsequenzen ist ein viel geringerer Grad an Sequenzwiederholungen zu erwarten (46. 47). Auch die ribosomalen Gene, die wahrscheinlich in vielfach wiederholter Form vorkommen (ca. 500fach), können diesen Befund nicht erklären (48.49). BRITTEN und DAVIDSON (50) haben hieraus eine Theorie zur Genregulation in höheren Organismen entwickelt, worin von der Annahme ausgegangen wird, daß die repetitiven Sequenzen die Kontrollstellen für die RNA-Synthese seien.

Viele Untersuchungen haben gezeigt, daß das Chromatin aus zwei unterschiedlichen Einheiten besteht: dem Euchromatin - oder diffuses Chromatin, das metabolisch aktiv ist - und dem Heterochromatin - oder kondensiertes Chromatin, das als relativ inert gefunden wurde (51.52). Verschiedene Autoren haben dieses kondensierte Material als genetisch inaktiv angesprochen (51-54). Es konnte nämlich gezeigt werden, daß Heterochromatin keine RNA-Vorstufen einbaut und auch in vitro keine RNA-Synthese ermöglicht, während mit Euchromatin in vitro Transcription ablaufen kann (53). Die Tatsache, daß die Reprimierung der Matritzenaktivität im Heterochromatin durch Behandlung mit proteolytischen Enzymen aufgehoben wird (55), deutet auf die Beteiligung von Proteinen an der Repression der DNA hin.

In diesem Zusammenhang wurden viele Untersuchungen vorgenommen, um die Frage zu beantworten, in welchem Umfang DNA im Chromatin frei zur Verfügung steht, bzw. von Proteinen bedeckt ist (56-59). Aus dem Schmelzverhalten von Chromatin aus Erbsenkeimlingen (60) läßt sich ermitteln, daß etwa 4% als freie DNA vorliegen, Transcriptionsmessungen an Chromatin (61-66) zeigen Werte von 10 - 20%, Actinomycin D-Bindungsstudien an

Kalbsthymuschromatin ergeben Werte von etwa 33% (67), und unter Benutzung von Poly-Lysin werden Werte von 38% (68) bis 50% (58) angegeben.

Es gibt Methoden, metabolisch aktivere Bereiche des Chromatins zu isolieren. Sie basieren auf zwei verschiedenen Kriterien: der unterschiedlichen Dichte aktiver und inaktiver Bereiche (69.70) und dem verschiedenen Proteingehalt, der zu einem unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten führt (71) und weiterhin eine verschiedenartige Empfindlichkeit für den Angriff von Nucleasen beinhaltet (58.72). Die DNA-Bereiche im Chromatin, die nicht von Protein bedeckt sind, enthalten die sogenannte freie DNA.

Es war eine Aufgabe dieser Arbeit, diese freie DNA zu untersuchen.

Die Proteine des Chromatins sind in letzter Zeit sehr eingehend untersucht worden. Sie werden auf Grund ihres unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens in verdünnter Mineralsäure (zum Beispiel 0,25 N HCl) unterteilt in die Gruppe der säurelöslichen Histone und der säureunlöslichen chromosomalen Nicht-Histon-Proteine (NHP) (73.74). Die Histone sind weitgehend charakterisiert (75) und die Primärstruktur ist von einigen Vertretern bestimmt (76-78). Seit der Beobachtung von HUANG und BONNER (79), daß die Histone bei Bindung an DNA die Transcription in vitro hemmen können, wurde ihnen viel Aufmerksamkeit als möglichen Repressoren gewidmet.

Eine Hypothese hierzu (80) geht davon aus, daß Komplexe von 10 bis 20 Histonmolekülen durch die Kopplung mit jeweils einem Leitmolekül spezifische Repressoren bilden. Als Leitmolekül könnte die chromosomale RNA dienen. Verschiedene Autoren konnten beispielsweise zeigen, daß nach Dissoziation von Chromatin, Zerstören von RNA und anschließender Rekonstitution des Nukleoproteins (81.82) die hieran transcribierte RNA bei weitem nicht in dem Maß mit in vivo gebildeter RNA um die Bindung an DNA kompetiert, wie es RNA vermag, die an rekonstituiertem Nucleoprotein ohne RNA-Zerstörung gebildet

wurde. Solange jedoch Zweifel an dem Vorhandensein der cRNA (37.38) bestehen, ist diese Hypothese sehr unsicher.

Eine andere Möglichkeit der regulativen Beeinflussung durch Histone ist die spezifische Modifikation von Seitenketten. So wurden Phosphorylierungen (83.84), Acetylierungen (85) und Methylierungen (86) als Variationen der Histone aufgezeigt. Es ist allerdings nicht wahrscheinlich, daß in solcher Weise eine wesentliche Änderung des Informationsgehaltes der Histonmolekel erreicht wird. Zumindest im Falle der Acetylierung, die an Histon IV auftritt, kann solches nicht gelten, denn hier wird nur ein Lysinrest acetyliert (87), und es kann nur eine Methylgruppe eingeführt werden. Angesichts von 25 basischen Gruppen ist die Änderung des Gesamtcharakters minimal.

Man kann heute sagen, daß die Histone aus verschiedenen Überlegungen heraus zur Feinregulation nicht geeignet erscheinen: Es gibt zu wenig verschiedene Histone, die Ähnlichkeiten der Histonverteilung in unterschiedlichen Geweben (88.89) und in verschiedenen Organismen (90.91) sind sehr groß, und es war bisher auch nicht möglich, eine spezifische Bindung der Histone an die DNA in vitro zu erreichen (92).

Der andere Teil der chromosomalen Proteine sind die Nicht-Histon-Proteine (NHP), über die im Vergleich zu den Histonen wenig Kenntnis vorhanden ist.

STEDMANN und STEDMANN (73) erhielten nach Behandlung der Zellkerne mit verdünnter Mineralsäure einen Rückstand, der etwa ein Drittel der chromosomalen Proteine enthielt. Eine entsprechende Fraktion gewannen MIRSKY und POLLISTER (93) durch saure Extraktion von Kalbsthymuschromatin. Es wurde der Gehalt an Tryptophan im Gegensatz zu den Histonen und der relativ hohe Anteil saurer Aminosäuren festgestellt (30.90). Auch später noch wurden die "sauren Proteine" durch Extraktion mit verdünntem Alkali aus dem Chromatin herausgelöst (94.95). Um die hierbei auftretende Denaturierung eines Teils der Proteine zu umgehen, wurden andere Extraktionsmethoden eingeführt. Von WANG wurde ein Verfahren mit Desoxycholat vorgeschlagen (96), andere

benutzten Natriumdodecylsulfat (30.97), 1 M Kochsalz (98), 2 M Kochsalz/5 M Harnstoff (99) oder Polyäthylensulfat (100).

Die Abtrennung von der DNA gelang im allgemeinen mühelos, die Entfernung der Histone jedoch konnten die verwendeten Methoden nicht in befriedigender Weise ermöglichen. In vielen Fällen wurde versucht, die Histone mit verdünnter Mineralsäure vor der Extraktion der Nicht-Histon Proteine zu entfernen. Das führte aber zu einer partiellen Denaturierung der Nicht-Histon Proteine und ein Teil der Histone wurde derart verändert, daß ihre saure Extraktion nicht mehr erfolgen konnte und sie so als Pseudo-Nicht-Histon Proteine erschienen (101). Bei der Extraktion mit 1 M Kochsalz wurden die Histone zusammen mit der DNA durch Erniedrigung der Kochsalzkonzentration ausgefällt, wobei eine Aggregatbildung zwischen Nicht-Histon Proteinen und Histonen (102) nicht ausgeschlossen werden kann; ähnliches gilt auch für die Isolierung dieser Proteine in Gegenwart von 5 M Harnstoff (99).

Dennoch haben solche Fraktionierungen interessante Ergebnisse erbracht. So wurde von LANGAN ein Phosphoprotein angereichert, an dem festgestellt wurde, daß die Phosphatgruppen als Phosphothreonin und Phosphoserin vorliegen (103). Auch andere Arbeitsgruppen haben diese interessante Klasse von Proteinen untersucht (95.104.105). Sehr informativ sind die eingehenden Untersuchungen von WANG (102.106), der den DNA- und RNA-Anteil (bis 0.7% bzw. 3.6%) und den Phosphatgehalt (bis 0.14%) dieser Proteine bestimmte. Die Nicht-Histon Proteine sind metabolisch sehr aktiv; durch Einbau von radioaktiven Aminosäuren konnte gezeigt werden, daß ihre Umsatzrate (107-110) doppelt so hoch ist wie die der Histone (111). Nach vielen vergeblichen Versuchen, die Heterogenität der NHP aufzuzeigen, gelang es trotz gegenteiliger Befunde (112), diesen Nachweis zu führen (30.95). Diese Arbeiten bilden den Hintergrund für Untersuchungen der möglichen Funktion der Nicht-Histon Proteine.

Die funktionellen Studien mit diesen Proteinen führten zur Formulierung eines regulativen Mechanismus. Das Modell ist von PAUL und GILMOUR (99.113) vorgeschlagen worden. Hierbei

sind alle Gene unspezifisch von Histonen gehemmt und nur durch Wechselwirkung der NHP mit den Histonen können die Gene aktiviert werden. So konnte gezeigt werden, daß die durch Histone unterbundene Transcription an DNA durch die Nicht-Histon Proteine wieder ermöglicht wird (114.115) und daß die synthetisierte RNA der in vivo gebildeten RNA gleicht (99).

Es wird als weitere Möglichkeit der Regulation die alleinige Beteiligung der NHP diskutiert. In Versuchen von PAUL und GILMOUR (99) und anderen (116) wurde deutlich, daß nach Extraktion von allen Histonen aus dem Chromatin noch längst nicht die Transcriptionsrate erreicht wird, wie mit reiner DNA. Diese Hemmung konnte weitgehend durch Extraktion der Nicht-Histon Proteine beseitigt werden.

Man kann hiernach erwarten, daß in dieser Gruppe von Proteinen regulative Faktoren enthalten sind. Es ergibt sich die Notwendigkeit, sie in ihrer Gesamtheit faßbar zu machen und in einer für funktionelle Studien geeigneten Weise aufzubereiten.

Dieses war die zweite Aufgabe der vorliegenden Arbeit.

Die Feststellung des Anteils von freien DNA-Strecken eröffnet Einblicke in die Chromatinstruktur und die Charakterisierung der betreffenden DNA ermöglicht neue Überlegungen zum Funktionieren der genetischen Einheit. Zusammen mit der Charakterisierung der Nicht-Histon Proteine zeigen sich möglicherweise neue Aspekte für die Erforschung des Chromatins.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Allgemeine Bestimmungsmethoden

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von LOWRY et al. (117) mit Serumalbumin (von Merck) als Standard. Desoxyribonucleinsäure wurde nach BURTON (118) bestimmt jeweils zusammen mit einer durch U.V.-Messung quantitierten reinen Leber-DNA-Lösung zum Vergleich. Die spektralphotometrischen Bestimmungen wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer durchgeführt. Für Lösungen nativer DNA mit der Extinktion: 1 bei 260 nm und der Schichtdicke 1 cm wurde eine Konzentration von 63 µg/ml angenommen. Die RNA-Bestimmungen erfolgten mit der Orcin-Methode von OGUR und ROSEN (119). Der Phosphatgehalt in Proteinen und Nucleinsäuren wurde nach BARTLETT (120) bestimmt. Die Kochsalzkonzentration wurde über eine Chloridbestimmung nach MOHR (121) im Alkalischen ermittelt. Zur Bestimmung von proteingebundener Radioaktivität wurden aliquote Proben auf Filterpapier (Schleicher & Schüll 2043 b) in 12% (w/v) TCA ausgefällt, wie es bei SEKERIS et al. (122) beschrieben ist. Zur Fällung von Nucleinsäure wurde 5% (w/v) TCA verwandt. Die Szintillationsflüssigkeit bestand aus: 5 g PPO (2,5-Diphenyloxazol), 200 mg POPOP (1,4-Di-2(5-phenyloxazolyl)benzol) in 1 Liter Toluol. Die Radioaktivität der Proben wurde in einem Nuclear Chicago Mark I Szintillationszähler bestimmt.

2. Freie Desoxyribonucleinsäure

2.1. Isolierung von Zellkernen

Die Präparation von Zellkernen wurde nach DUKES et al. (123) mit den Änderungen nach BEATO et al. (124) durchgeführt. Etwa 150 g schwere männliche Wistar BR II-Ratten wurden getötet, die Lebern mit 10 ml eiskaltem TSS-Puffer (0,25 M Sucrose - 10 mM $MgCl_2$ - 25 mM KCl - 50 mM Tris/ HCl - pH 7,5) durchspült, herausgeschnitten und anschließend mit einer Schere

zerkleinert. Das Gewebe wurde in 3 Volumina TSS-Puffer mit einem Gerät nach POTTER-ELVEHJEM homogenisiert, erst durch 2 Lagen, dann 6 Lagen Mull filtriert und bei 3000 UpM in einem SS-34-Rotor von SORVALL (g_{max}:1000) 7 Minuten lang zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in TSS suspendiert und anschließend wie vorher zentrifugiert. Die sedimentierten Kerne wurden in TSS aufgenommen, mit dem gleichen Volumen 1% Triton X 100 (Alkyl-phenoxy-polyäthoxy-äthanol) in TSS vermischt und direkt hinterher durch Zentrifugation bei 1000 g 7 Minuten lang sedimentiert. Abschließend wurden die Kerne zur Entfernung von Detergenz noch 2 mal in TSS gewaschen.

2.2. Präparation von Chromatin

Das Chromatin wurde nach der Methode von MARUSHIGE und BONNER (90) isoliert mit dem Unterschied, daß von Kernen ausgegangen wurde (125). Zellkerne von 5 Ratten (ca. 30 g Leber) wurden in 100 ml 75 mM NaCl - 24 mM EDTA/NaOH - pH 8,0 suspendiert und 15 Minuten lang bei 3500 UpM (g_{max}:1500) in einem SS-34-Rotor von SORVALL zentrifugiert. Der Niederschlag wurde noch einmal im selben Volumen des gleichen Mediums suspendiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment 2 mal mit 100 ml 50 mM Tris/HCl - pH 8,0 gewaschen und dann in 15 ml 10 mM Tris/HCl - pH 8,0 aufgenommen. 25 ml 1,7 M Sucrose in 10 mM Tris/Hcl - pH 8,0 wurden in einem Zentrifugenröhrchen mit jeweils 5 ml Kernsediment-Suspension überschichtet. Die oberen 2/3 des Röhrcheninhalts wurden verrührt, und dann wurde 2 Stunden lang bei 22 000 UpM in einem SW 25.2-Rotor von BECKMANN zentrifugiert. Das gelatinöse Sediment wurde als Chromatin bezeichnet.

2.3. Herstellung des Ausgangsmaterials

Zur Isolierung von nicht-proteinbedeckter DNA wurde von Chromatin ausgegangen. Dieses wurde in 2,5 mM Natriumphosphatpuffer - pH 6,7 aufgenommen und 3 Minuten mit dem Virtis-Homogenisator unter Eiskühlung bei 81 Volt - Stufe 8 behandelt. Danach wurde 20 Minuten bei 13 500 UpM (g_{max}: 22 000) in einem

SS-34-SORVALL Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verdünnt, bis eine Extinktion bei 260 nm von ungefähr 1,9 erreicht war (entspricht: 120 µg DNA/ml = 0,39 µMole Nukleorid/ml).

2.4. Titration mit Poly-Lysin

Die verdünnte Nucleoproteinlösung wurde unter starkem Rühren mit kleinen Portionen Poly-Lysin (Poly-D-Lysin $\overline{MG}$ 3000, $\overline{P}$ 14; $\overline{MG}$ 140 000, $\overline{P}$ 670, von Serva) - als Lösung von 1 µMol mono-Lysin/ml in 2,5 mM Natriumphosphatpuffer - pH 6,7 (= 0,209 mg Poly-Lysin·HBr/ml) - versetzt. Nach jeder erneuten Zugabe von Poly-Lysin wurde ein bestimmter Bruchteil entnommen und jeweils auf einen gemeinsamen Endwert aufgefüllt. Nach Zentrifugation im SS-34-SORVALL Rotor bei 10 000 UpM (g_{max}: 12 000) wurde im Überstand die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Als weitere Zugabe von Poly-Lysin keine entsprechende Erniedrigung der Extinktion bewirkte, wurde die gesamte Mischung bei 10 000 UpM zentrifugiert. Der Nucleoprotein - Poly-Lysin - Niederschlag wurde mehrmals durch Suspendieren im Puffer und Abzentrifugieren gewaschen.

2.5. Pronasebehandlung

Das mit Poly-D-Lysin präzipitierte Nucleoprotein wurde zur Entfernung des vorhandenen Proteins mit Pronase (Merck) behandelt. Der Niederschlag wurde in 5 mM Natriumphosphatpuffer - pH 6,7 fein suspendiert (ca. 1 ml/1 mg Protein). 2 Stunden im selben Puffer vorinkubierte Pronase (1 mg/ml) wurde zu gleichen Teilen hinzugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden bei 37°C wurde abzentrifugiert und mit dem Niederschlag noch einmal in gleicher Weise verfahren. Das so gewonnene Sediment wurde 5 mal gewaschen.

2.6. Nucleaseverdauung

DNA-Bereiche, die nicht von Poly-D-Lysin bedeckt waren, wurden durch Behandlung mit DNase I (Merck) in lösliche Form

überführt und abgetrennt. Zu einer Suspension des gewaschenen Komplexes von ca. 600 µg DNA in 1 ml 5 mM Natriumphosphatpuffer - pH 6,7 mit 1 mM $MgCl_2$ wurden 80 Einheiten DNase I (= 40 µg) in einem Milliliter desselben Puffers hinzugefügt. Nach dreistündiger Inkubation wurde abzentrifugiert und das Sediment mehrmals gewaschen. Der Verlauf der Nucleasewirkung wurde verfolgt, indem zu verschiedenen Zeiten Proben entnommen, mit dem gleichen Volumen 10 % PCA versetzt und nach Zentrifugation die Extinktionen bei 260 nm bestimmt wurden.

2.7. Reinigung mit Hydroxyapatit

Die Nucleinsäure wurde von dem Poly-Lysin durch Bindung an Hydroxyapatit abgetrennt. Der DNA-Lysinkomplex wurde in 2 M NaCl - 50 mM Natriumphosphatpuffer - pH 6,9 gelöst und auf eine Hydroxyapatitsäule (1 ml/1 mg DNA) äquilibriert mit demselben Puffer aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer wurde die absorbierte DNA mit 0,5 M Natriumphosphatpuffer - pH 6,9 eluiert. Die so gewonnene DNA-Lösung wurde je nach Verwendungszweck gegen 10 mM Tris/ HCl - pH 7,9 bzw. gegen 0,12 Natriumphosphatpuffer - pH 6,8 dialysiert und dann durch Ultrafiltration (Amicon) bis etwa 2 mg/ml konzentriert.

2.8. Sucrosegradientenzentrifugation

Die linearen Sucrosegradienten - 5 bis 18,5% (w/w) - in 10 mM Tris/HCl - pH 7,9 wurden mit einem SW 56-Rotor von BECKMANN mit 39 000 UpM 15 Stunden lang bei 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden nach Beendigung der Zentrifugation durch ein Loch im Röhrchenboden ausgetropft und fraktioniert. Die Sucrosekonzentration wurde durch Bestimmung des Brechungsindex ermittelt. Die Verteilung der DNA wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt.

Die Auswertung wurde nach MC EWEN (126) durchgeführt (r_o = 5,84 cm, r_{max} = 11,64 cm) mit einer Dichte für DNA in Sucrose von 1,4 g/ccm (127). Die Errechnung des entsprechenden Molekulargewichts für doppelsträngige DNA aus den Sedimentationskon-

stanten erfolgte mit von VAN DER SCHANS et al. (128) übernommenen Faktoren.

Eine zweite Auswertung erfolgte nach Eichung des Systems mit einer DNA von definierter Sedimentationszahl. Es wurde radioaktiv markierte SV 40 - DNA mit einer S-Zahl von 21 (129) benutzt.

2.9. CsCl-Gleichgewichtszentrifugation

Die Anfangsdichte der Cäsiumchloridlösung betrug 1,7 g/ccm (4,3 g CsCl und 3,41 ml 10 mM Tris/HCl - pH 7,9 = 7,7 g/4,55 ml). Es wurden 50 bis 100 µg DNA in 50 µl hinzugefügt. Die Zentrifugation wurde in einem SW 56-Rotor von BECKMANN mit 34 000 UpM 48 Stunden lang bei 25°C durchgeführt. Die Proben wurden nach Beendigung des Laufes durch ein Loch im Röhrchenboden ausgetropft. Die CsCl-Dichte wurde durch Bestimmung des Brechungsindex ermittelt.

2.10. Renaturierungskinetik

Die DNA wurde in 0,12 M Natriumphosphatpuffer - pH 6,8 auf 1 mg/ml (entspricht: $3{,}25 \times 10^{-3}$ M an Nucleotid) verdünnt und dann mit einem MSE-Ultraschallgerät eine Stunde lang beschallt (output: 2 - 0,8 mA). Es wurden Lösungen verschiedener Konzentration (10 - 1000 µg/ml = $3{,}25 \times 10^{-5}$ M - $3{,}25 \times 10^{-3}$ M an Nucleotid) hergestellt und dann, nach Erhitzen auf 100°C (10 min), für unterschiedliche Dauer bei 60°C inkubiert. In diesen Proben wurde Doppelstrang- von Einzelstrang-DNA unter Anwendung von Hydroxyapatit (100 µg DNA/ml Hydroxyapatit) abgetrennt. Die Menge nicht gebundener Einzelstrang-DNA wurde im Eluat durch UV-Messung bestimmt. Die Quantitierung erfolgte, indem für Einzelstrang-DNA eine 1,49fache Extinktion bei 260 nm im Vergleich zu nativer DNA eingesetzt wurde.

2.11 Radioaktive Markierung von RNA

Es wurde zwei Ratten (120-150 g) je 0,1 mCi Orotsäure-5-H3 (20 Ci/mMol) in 100 µl i.p. injiziert. Nach 30 Minuten wurden

die Tiere getötet und Chromatin aus den isolierten Leberzellkernen präpariert. Hieraus wurde wie in 2.3. - 2.7. beschrieben freie DNA isoliert. Der Anteil an schnellmarkierbarer RNA in den verschiedenen Fraktionen wurde bestimmt.

2.12. Transcriptionsstudien

Die Transcriptionsuntersuchungen wurden mit verschiedenen DNA-Arten, so wie in 3.9. beschrieben, durchgeführt. Die DNA-Konzentrationen betrugen 0,5 - 2 µg/Ansatz. Einzelstrang-DNA wurde durch thermische Denaturierung hergestellt. Es wurden folgende Matritzen untersucht: freie DNA, Gesamt-DNA, beschallte DNA und die denaturierten Formen derselben Proben.

3. Chromosomale Nicht-Histon Proteine

3.1. Isolierung von chromosomalen Proteinen

Die chromosomalen Proteine wurden aus Chromatin wie folgt isoliert (Tabelle 1):

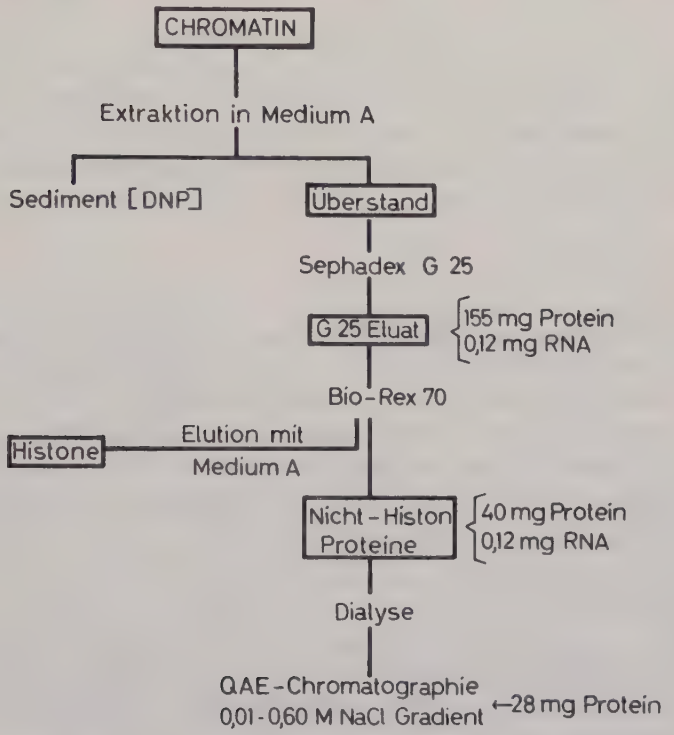
Chromatin wurde in einem Extraktionspuffer (A) bestehend aus 2 M NaCl - 5 M Harnstoff - 1 mM Mercaptoäthanol - 0,5 mM $MgCl_2$ - 1 mM EDTA und 10 mM Tris/HCl - pH 8,3 aufgenommen. Die durch das Eigenvolumen des Nucleoproteins erfolgte Verdünnung des Extraktionsmittels wurde durch Zugabe einer entsprechenden Menge konzentrierteren Puffers korrigiert. Zur Extraktion von Chromatin aus 10 Rattenlebern wurde auf 100 ml aufgefüllt und auf dem Magnetrührer gerührt, bis eine einheitliche Lösung vorlag. Diese wurde anschließend 24 Stunden lang bei 60 000 UpM ($\bar{g}$: 230 000) in einem BECKMANN Festwinkelrotor - Typ 65 zentrifugiert.

Das Sediment (Desoxyribonucleoprotein) wurde für dieses betreffende Untersuchungen ein zweites Mal in gleicher Weise behandelt.

Der Überstand wurde zur Entfernung flotierenden Materials durch Faltenfilter gegeben. Die NaCl-Konzentration des Fil-

trats wurde durch Umsalzen über Sephadex - G 25 (Pharmacia, Uppsala) auf 0,05 M erniedrigt (Medium B).

Tabelle 1: Präparationsschema der Nicht-Histon Proteine aus Rattenleberchromatin



3.2. Gewinnung von chromosomalen Nicht-Histon Proteinen

Die Histone wurden von den chromosomalen Nicht-Histon Proteinen durch Bindung an einen Ionenaustauscher abgetrennt.

Die chromosomalen Proteine aus 20 Rattenlebern wurden durch eine Säule von Bio-Rex 70 (Bio-Rad, München) in der Natrium-Form mit den Abmessungen 5 cm x ϕ 2 cm gegeben. Es wurde mit 4 Säulenvolumina Puffer nachgewaschen. Im Eluat befanden sich

die Nicht-Histon Proteine.

Die Histone konnten durch Elution mit dem Extraktionsmedium A von dem Säulenmaterial abgelöst werden.

Die histonfreie Proteinlösung (ca. 40 mg) wurde 3 mal gegen je 2 Liter Medium A ohne zugesetztes NaCl dialysiert, so daß eine Chloridendkonzentration erreicht wurde, die niedriger als 9 mM war. Diese Lösung wurde auf eine QAE-Sephadex- A 25 (Pharmacia, Uppsala) - Säule (44 cm x Ø 1,8 cm; 44 cm x Ø 1,4 cm) aufgetragen und, nachdem mit einem Säulenvolumen (ca. 100 ml) Puffer gewaschen war, wurde mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0,01 M - 0,6 M NaCl (200/200 ml; 100/100 ml) eluiert. Es wurden Fraktionen von 5 ml bzw. 2 ml gesammelt.

3.3. Behandlung mit RNase

Es wurde eine RNase-Behandlung der Nicht-Histon Proteine in folgender Weise durchgeführt: 100 ml Enzite-RNase (Seravac; 63,2 mUnits/mg) wurden zu 40 mg Nicht-Histon Protein in 285 ml Medium B gegeben. Diese Suspension wurde 9 Stunden bei 25°C leicht gerührt. Das matrixgebundene Enzym wurde danach durch Filtration entfernt. Die Fraktionierung wurde dann in der beschriebenen Weise durchgeführt.

3.4. Thiolgehalt

Die Bestimmung des Thiolgehalts einzelner Proteinfraktionen wurde mittels Tritium-markiertem Jodacetat durchgeführt (120).

30 Mikrogramm Protein in einem Milliliter 30 mM Mg-acetat - 30 mM Tris/Acetat - pH 8,8 wurden mit 50 Mikrocurie Jodacetat-2-T (149 mCi/mMol) in 0,05 ml Äthanol für 12 Stunden bei 37°C behandelt. Die eingebaute Radioaktivität wurde auf Filterpapierplättchen bestimmt.

3.5. Dinitrophenylierung

Die freien Aminogruppen der chromosomalen Proteine wurden unter Anwendung von SANGERS DNFB-Methode (130) nach STAHL (131)

bestimmt. - Die Proteine wurden mit 12% TCA ausgefällt, mit TCA, Äthanol und Äther gewaschen und über Phosphorpentoxid getrocknet. Dann wurden oxidierbare Gruppen mit Perameisensäure oxidiert, erneut mit TCA präzipitiert und mit Äthanol und Äther gewaschen. Das Proteinpulver wurde in 0,05 M KCl - pH 9 fein suspendiert und mit einer äthanolischen Lösung von DNFB 3 Stunden lang bei 40°C am PH-Stat behandelt. Die dinitrophenylierten Aminosäuren wurden durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgelplatten F 254, Merck) aufgetrennt. Das Kieselgel war mit der unteren Phase eines Gemischs von: Toluol - Pyridin - Chloräthanol - 0,8 N NH_3 (100 - 30 - 60 - 60) äquilibriert. Das zweidimensionale Chromatogramm der ätherlöslichen Fraktionen wurde dann entwickelt; zuerst mit der oberen Phase der genannten Mischung, dem ein zweiter Lauf senkrecht zur Richtung des ersten mit Chloroform - Benzylalkohol - Essigsäure (70 - 30 - 3) folgte. Die ätherunlöslichen Fraktionen wurden mit einem Gemisch aus n-Propanol - 34% NH_3 (70 - 30) aufgetrennt.

3.6. Einbau radioaktiver Aminosäure

Die Markierung der Nicht-Histon Proteine mit radioaktiver Aminosäure wurde in folgender Weise vorgenommen. Insgesamt 5 mCi (L-^{3}H)-Tyrosin (1 Ci/mMol) in 2% Äthanol wurden 10 Ratten i.p. injiziert. Nach einer Stunde wurden die Tiere getötet und die Präparation in üblicher Weise vorgenommen. Die spezifische Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde wie in 1. beschrieben bestimmt.

3.7. Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS

Es wurden analytische Gelelektrophoresen nach SHAPIRO et al. (132) mit den Änderungen von WEBER und OSBORN (133) durchgeführt. 50-80 Mikrogramm Protein wurden auf 10% Gele mit den Abmessungen 0,6 x 7,4 cm aufgetragen und 12 - 14 Stunden mit 8 mA/Gel der Elektrophorese in 0,1 M Natriumphosphatpuffer - pH 7 unterworfen. Danach wurden die Proteinbanden in einer wäßrigen Lösung von 0,25% Coomassie Blau - 9,2% Essigsäure -

45,5% Methanol durch eine dreistündige Behandlung gleichzeitig fixiert und angefärbt. Die Entfernung überschüssigen Farbstoffs wurde durch Diffusion in einer wäßrigen Lösung von 7,5% Essigsäure - 5% Methanol 36 Stunden lang bei 40°C erreicht.

3.8. Alkalische Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Harnstoff

Die alkalischen Elektrophoresen wurden nach BENJAMIN und GELLHORN (95) durchgeführt. Etwa 50 Mikrogramm Protein wurde auf 10% Gelen von den Abmessungen 0,6 x 7,5 cm bei 4°C mit 3 mA/Gel 3 Stunden lang aufgetrennt. Die Fixierung - Färbung und Entfärbung wurde wie in 3.7. beschrieben vorgenommen.

3.9. Rekombination und Transcription

Die isolierten Nicht-Histon Proteine wurden in Medium A mit DNA im Verhältnis von etwa 3 : 1 zusammengegeben. Die Konzentration an Protein war 890 Mikrogramm/ml. Die NaCl-Konzentration wurde in Gegenwart von 5 M Harnstoff mittels Dialyse in Stufen über 1 M - 0,8 M - 0,6 M bis 0,4 M NaCl erniedrigt. Dann wurde der Harnstoff entfernt und anschließend wurde die Probe gegen 1/15 M Tris/HCl - pH 7,9 dialysiert. Diese Lösung wurde für Transcriptionsstudien benutzt.

Der Ansatz hierfür enthielt folgende Stoffe in den angegebenen Konzentrationen:
ATP, GTP, CTP je 10^{-3} M, UTP 10^{-5} M (10^{-4} M), 1 µCi ^{14}C-UTP (1 Ci/mMol) pro 150 µl, $(NH_4)_2SO_4$: 6,6 x 10^{-2} M - $MnSO_4$: 3 x 10^{-3} M 8,4 µg DNA pro 150 µl und Rattenleber-B-Polymerase (E.coli-Polymerase). Das Volumen des Inkubates war 150 µl. Die gesamte Lösung wurde nach Beendigung der Reaktionszeit bei 37°C von 60 Minuten (27 Minuten) auf Papierplättchen gebracht und zur Messung der in Säure fällbarem Material gebundenen Radioaktivität wie in 1. beschrieben behandelt.

III. ERGEBNISSE

1. Freie Desoxyribonucleinsäure

1.1. Titration mit Poly-Lysin

Um den Anteil nicht proteinbedeckter DNA festzustellen, wurde Poly-Lysin an die freien DNA-Bereiche im Chromatin gebunden. Die hierdurch bewirkte Präzipitation fand nach Sättigung der verfügbaren Strecken ein Ende. Die Titration von Chromatin mit Poly-D-Lysin ergab, daß 32 $\pm$ 4 % der jeweils vorhandenen Nucleotide mit Lysingruppen titrierbar sind (Abb. 6).

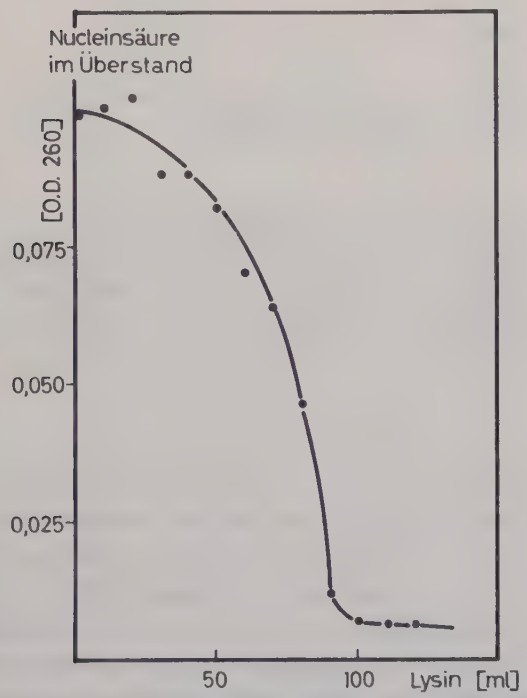


Abb. 6
Titration von Chromatin mit Poly-Lysin. Zu Rattenleberchromatin (0,487 µMole Nucleotid/ml) wurden steigende Mengen Poly-Lysin (0,311 µ Mole mono-Lysin/ml) unter heftigem Rühren zugesetzt. An verschiedenen Punkten der Titration wurden Aliquote entnommen, bei 10 000 UpM zentrifugiert und im Überstand wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt.

Eine signifikante Ablösung von Chromatin-Proteinen war erst feststellbar bei einem großen Überschuß von Poly-Lysin (Abb. 7).

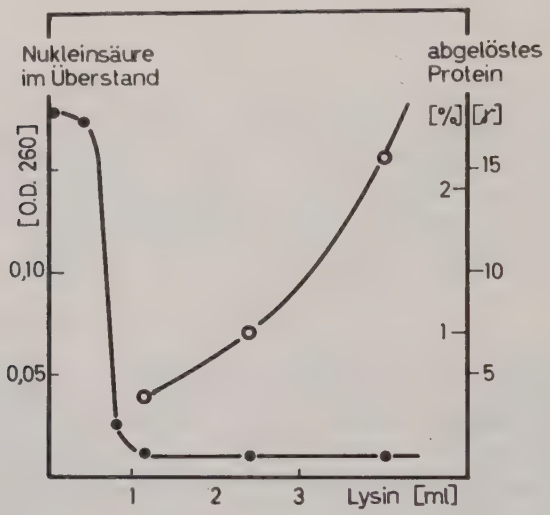


Abb. 7 Poly-Lysin-Titration und Proteinablösung.
Je 2 ml Chromatin (ca. 68 µg DNA/ml) wurden mit den Angegebenen Mengen Poly-Lysin (0,354 µMole mono-Lysin/ml), nach Auffüllen mit Puffer auf ein gemeinsames Endvolumen, versetzt. Nach Zentrifugation wurde im Überstand die optische Dichte bei 260 nm und der Proteingehalt bestimmt.

1.2. Nucleaseverdauung

Die freie DNA wurde hierauf isoliert. Nach Abdeckung der freien Bereiche mit Poly-Lysin wurden die chromosomalen Proteine mit Pronase verdaut und die so freigelegte DNA mit DNase I abgebaut.

Die Entfernung von DNA-Bereichen, die nicht mit Poly-D-Lysin bedeckt waren, durch DNase I-Einwirkung beruhte auf dem Befund, daß mit Poly-D-Lysin bedeckte DNA von DNase I nur zu 1 - 3% abgebaut wurde. Im Gegensatz dazu sind in Histon-DNA-

Komplexe bis zu 65 % der darin enthaltenen DNA verdaubar. Zur Verdauung von 170 µg DNA/ml genügten in unseren Versuchen 18 Einheiten DNase I/ml (Abb. 8). Für die Spaltung nicht mit Poly-D-Lysin bedeckter DNA im Chromatin war also, nach Proteolyse durch Pronase, eine Konzentration von 40 Einheiten DNase I/ml/300 µg DNA (angreifbar ca. 200 µg DNA) ausreichend.

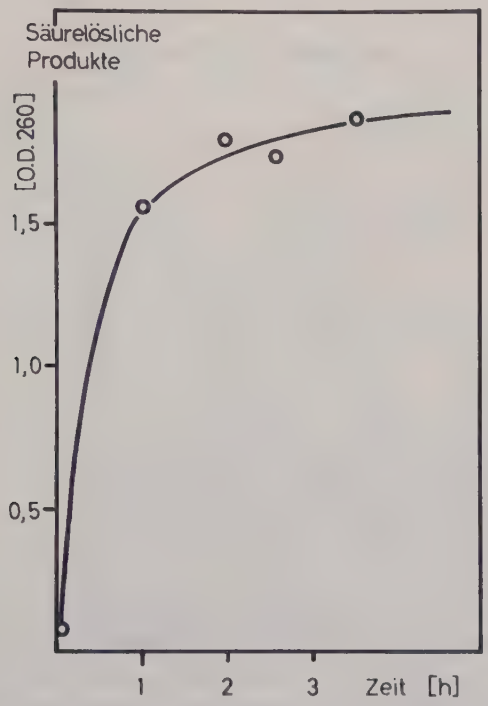


Abb. 8

Hydrolyse von DNA mit DNase I. Rattenleber-DNA (170 µg/ml) wurde mit DNase I (9 µg/ml = 18 Einheiten/ml) bei 37°C inkubiert. Der Abbau wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm im Überstand nach Fällung mit dem gleichen Volumen 10% PCA verfolgt.

1.3. Molekulargewichtsbestimmung

Zur Ermittlung des durchschnittlichen Molekulargewichtes wurden Sedimentationsstudien vorgenommen. Nach der Bestimmungsmethode von MC EWEN (126) ergab sich eine mittlere Sedimentationskonstante von 10 ± 0,8 S, was einem Molekulargewicht

von etwa 1,3 ± 0,3 Millionen entspricht (Abb. 9).

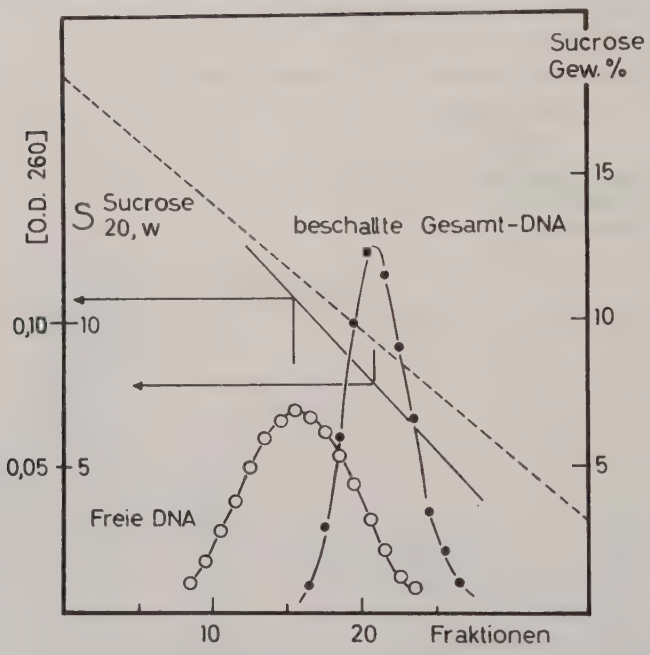


Abb. 9 Molekulargewichtsbestimmung durch Sucrosegradienten zentrifugation.
Es wurden Proben von 20 µl (1,7 mg DNA/ml) auf 4,7 ml 5 bis 18,5% lineare Sucrosegradienten aufgetragen und 15 Stunden lang bei 39 000 UpM zentrifugiert.

Bei Benutzung von SV 40-DNA als Eichsubstanz ergab sich eine Sedimentationskonstante von 7,9 S. Das kommt einem mittleren Molekulargewicht von $0{,}74 \cdot 10^6$ gleich. Eine DNA dieser Größe würde aus ca. 1200 Nucleotidpaaren bestehen (Abb. 10). Was in Abb.10 wegen eines ungünstigen Auswertungsverfahrens nicht sichtbar wird, kann aus Abb. 9 abgelesen werden: ungefähr die Hälfte (46 %) der freien DNA ist größer als 7,9 S und 10 % hat eine Sedimentationskonstante größer als 9,4 S.

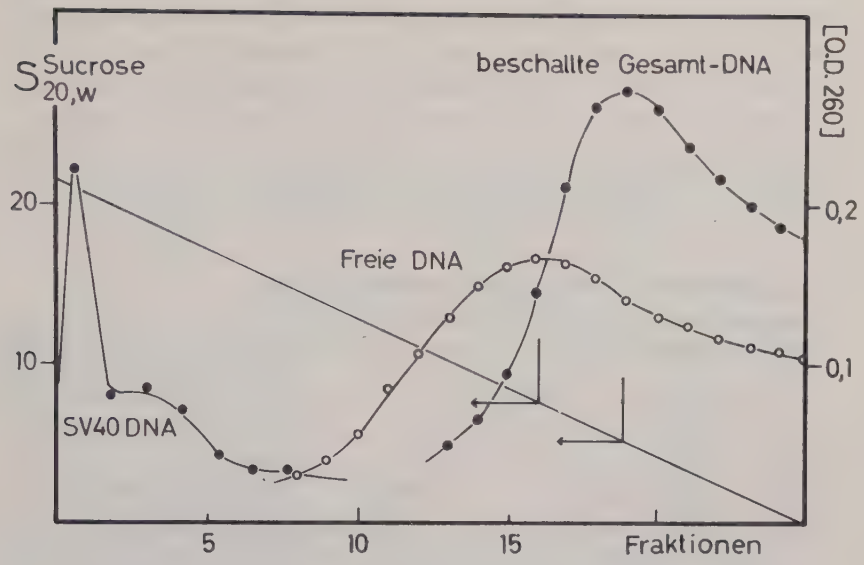


Abb. 10 Molekulargewichtsbestimmung relativ zu SV 40-DNA mit Sucrosegradientenzentrifugation.
Die Zentrifugation wurde auf 5 bis 20 % Gradienten 13 Stunden lang durchgeführt. Die übrigen Bedingungen waren wie in Abb. 9 beschrieben.

1.4. Schwebedichte

Die Bestimmung der Schwebedichte der freien DNA mit CsCl-Gleichgewichtszentrifugation ergab keinen Unterschied zur Schwebedichte der Gesamt-DNA. Die gemessenen Werte waren identisch. Mit der verwandten Fraktionierungsmethode wurden demnach keine DNA-Strecken mit einer Dichte isoliert, die von der Dichte der Gesamt-DNA abweichen.

1.5. Renaturierungskinetik

Es wurde untersucht, ob in der isolierten DNA repetitive Sequenzen angereichert waren. Es wäre dann eine veränderte Re-

naturierungskinetik zu erwarten gewesen. Die Untersuchung der Renaturierungsgeschwindigkeit nach thermischer Denaturierung der DNA wurde unter Anwendung von Hydroxyapatit durchgeführt. Die Abb. 11 zeigt, daß die Renaturierungsgeschwindigkeit der freien DNA nicht von dem Verhalten der Gesamt-DNA abweicht.

Der Anstieg der Extinktion bei 260 nm der freien DNA beim Erhitzen auf 100°C war mit dem der Gesamt-DNA identisch.

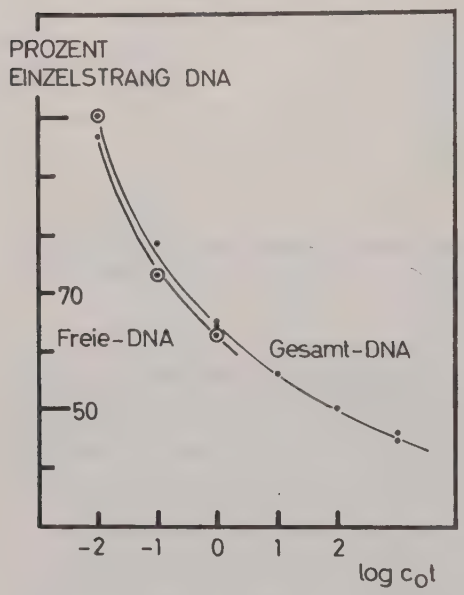


Abb. 11
Renaturierungsgeschwindigkeit von Gesamt-DNA und freier DNA. Nach thermischer Denaturierung der beschallten DNA wurde der Doppelstranganteil nach verschiedenen Renaturierungszeiten von der Einzelstrang-DNA durch Bindung an Hydroxyapatit abgetrennt. Der nicht renaturierte Teil der DNA wurde bestimmt.

1.6. Schnellmarkierbare RNA

Der Verbleib von schnellmarkierbarer RNA des Chromatins im Präparationsgang für freie DNA wurde durch Bestimmung der radioaktiven RNA in den einzelnen Fraktionen festgestellt, um die Verteilung der codierenden DNA zu ermitteln. Bei der Präzipitation mit Poly-Lysin verblieb im Überstand 16 % der Radioaktivität. Von der mit Lysin präzipitierten radioaktiven RNA ging 50 % bei der Pronasebehandlung in Lösung und 12 %

wurde bei der DNase I-Behandlung verloren. Der Rest von 38 % wurde zusammen mit der freien DNA erhalten.

1.7. Matrizenaktivität verschiedener DNA-Arten

Zur Untersuchung, ob sich die freie DNA in ihrer funktionellen Aktivität von der Gesamt-DNA unterscheidet, wurden Transcriptionsmessungen durchgeführt. Die vergleichenden Untersuchungen der Matrizenaktivität von freier DNA, Gesamt-DNA und beschallter Gesamt-DNA zeigten, daß freie DNA durch Rattenleber-B-Polymerase um ein Vielfaches besser transcribierbar war als Gesamt-DNA (Abb. 12 A/C). Um festzustellen, ob die erhöhten

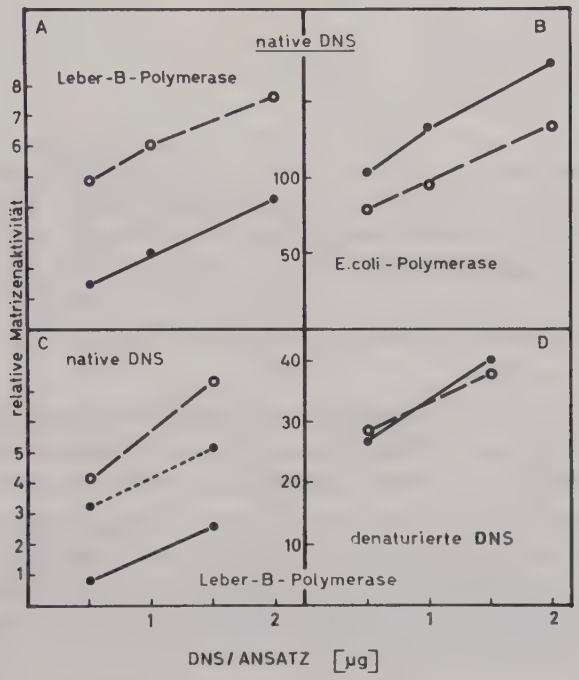


Abb. 12 Aktivität verschiedener Matrizen.
Es wurden Transcriptionsstudien durchgeführt mit:
freier DNA — — —○— — —
Gesamt-DNA ———●———
und beschallter Gesamt-DNA – – – –●– – – –

Werte durch die verminderte Länge der freien DNA bedingt sein konnten, wurde Gesamt-DNA durch Beschallen in kleinere Stücke zerlegt. Auch die hiermit erreichten Werte lagen deutlich unter denen von freier DNA (Abb. 12 C). Nach Denaturierung zeigten Gesamt-DNA und freie DNA die gleiche Matrizenaktivität (Abb. 12 D).

Bei Transcriptionen mit E. coli-Polymerase kehrte sich das vorher beobachtete Aktitivätsverhältnis um, und es wurde Gesamt-DNA besser transcribiert als freie DNA (Abb. 12 B).

2. Chromosomale Nicht-Histon Proteine

2.1.1. Präparation der chromosomalen Nicht-Histon Proteine

Die chromosomalen Proteine wurden durch Extraktion des Chromatins mit 2 M NaCl - 5 M Harnstoff bei pH 8,3 in Lösung gebracht und von der DNA durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Die Entfernung der Histone mit Bio-Rex 70, unter Bedingungen, die Präzipitationen ausschlossen, war die Voraussetzung für eine erfolgreiche Fraktionierung der Nicht-Histon Proteine mit QAE-Sephadex.

Wie aus Abb. 13 hervorgeht, war das Elutionsprofil der Proteine heterogen. Protein wurde ab einer Kochsalzkonzentration von 0,02 M bis zu einer Molarität von etwa 0,34 M eluiert.

Das UV-Licht absorbierende Material, das bei 0,45 M NaCl eluierte, war Lowry-negativ, somit kein Protein und zeigte ein typisches Nucleinsäurespektrum. Mit einer positiven Burton-Reaktion ließ sich diese Fraktion als DNA identifizieren.

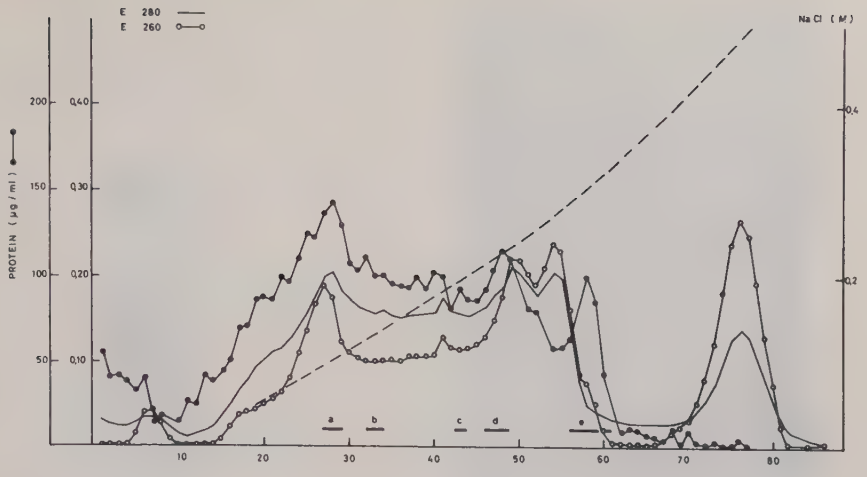


Abb. 13 Chromatographie von Nicht-Histon Proteinen an QAE-Sephadex-A 25.
Vierzig Milligramm Nicht-Histon Protein wurde an eine QAE-Sephadex-Säule (44 cm x 1,8 cm) gebunden. Die Proteine wurden mit einem NaCl-Gradienten von 0,01 - 0,60 M (200/200 ml) eluiert. Es wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt.

2.1.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Heterogenität der chromosomalen Nicht-Histon Proteine wurde besonders deutlich nach Polyacrylamid-Gelelektrophoresen in Gegenwart von SDS. Jede der ausgewählten Fraktionen war eine sehr heterogene Mischung von Proteinen (Abb. 14). Durch Vergleich mit SDS-Gelen von Gesamthiston konnte eine Kontamination mit Histon ausgeschlossen werden (Abb.15).

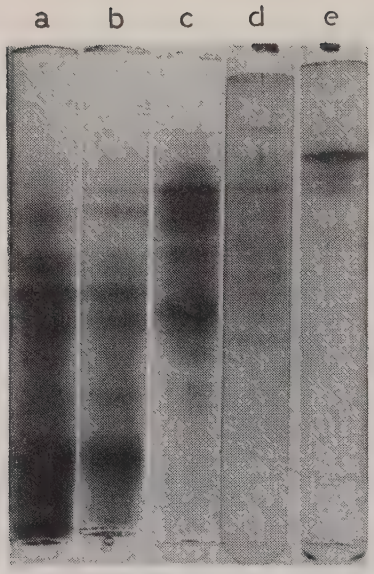


Abb. 14 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Nicht-Histon Protein Fraktionen in Gegenwart von SDS.
Es wurden Fraktionen des QAE-Sephadex-Eluates vereinigt (Abb. 13, a-e). Die Elektrophorese wurde auf 10% Gelen durchgeführt. Die Richtung der Elektrophorese war von oben nach unten.

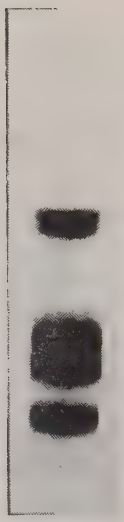


Abb. 15 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Gesamt-Histon auf 10% Gelen in Gegenwart von SDS (134). Die Richtung der Elektrophorese war von oben nach unten.

2.2. Dinitrophenylierung

Um zu prüfen, ob das heterogene Verhalten der Nicht-Histon Proteine von Degradation herrührte, wurde eine Untersuchung der freien Aminogruppen des gesamten aus dem Chromatin extrahierten Proteins direkt nach Extraktion (A) und nach 48 Stunden bei Raumtemperatur (B) durchgeführt. Wie aus Abb. 16 deutlich wird, waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar, was degradierende Vorgänge unwahrscheinlich machte.

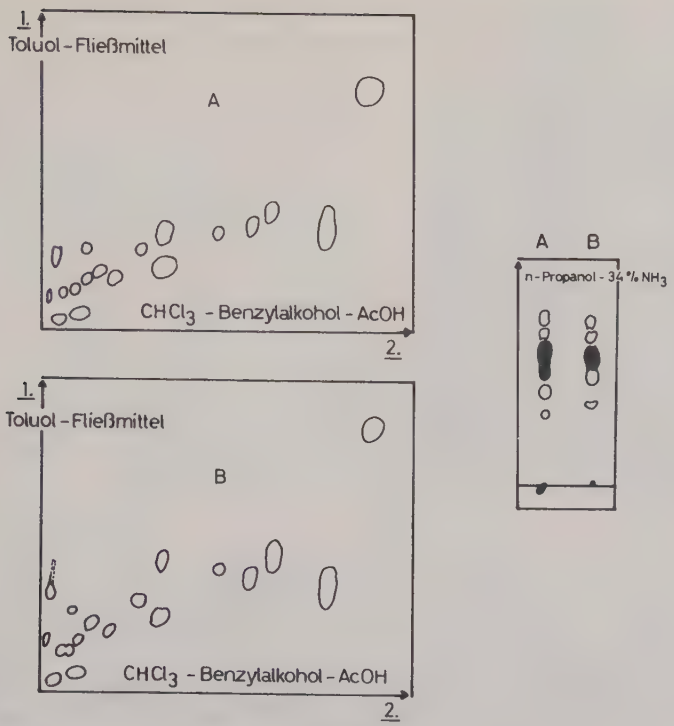


Abb. 16 Dünnschichtchromatogramme von den Aminosäuren der dinitrophenylierten chromosomalen Proteine.
Die zweidimensionalen Chromatogramme zeigen die ätherlöslichen und das eindimensionale die übrigen dinitrophenylierten Aminosäuren der Proteine direkt nach Abtrennung der DNS (A) und nach 48 Stunden bei Raumtemperatur (B).

2.3. Behandlung mit RNase

Wegen der Tatsache, daß die Proteinpräparationen erhebliche Mengen von RNA enthielten, bestand die Möglichkeit, daß die Heterogenität der Nicht-Histon Proteine auf dem Gehalt von verschiedenen RNA-Komponenten beruhen konnte. Deswegen wurde die in II.3.3. beschriebene RNase-Behandlung der Nicht-Histon Proteine durchgeführt. Dieses Verfahren verringerte nicht das

heterogene chromatographische und elektrophoretische Verhalten der Proteine (Abb. 17 und Abb. 18).

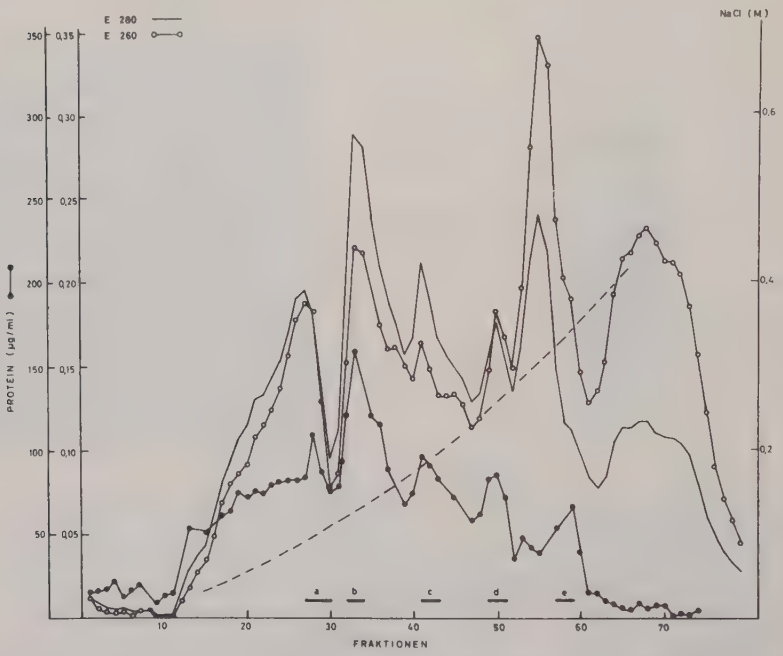


Abb. 17 Chromatographie der Nicht-Histon Proteine an QAE-Sephadex-A 25 nach RNase-Behandlung der Proteine. Etwa 40 mg Nicht-Histon Protein wurde mit Enzite-RNase behandelt. Nach Abfiltrieren der RNase wurde die Fraktionierung wie in Abb. 13 beschrieben durchgeführt.

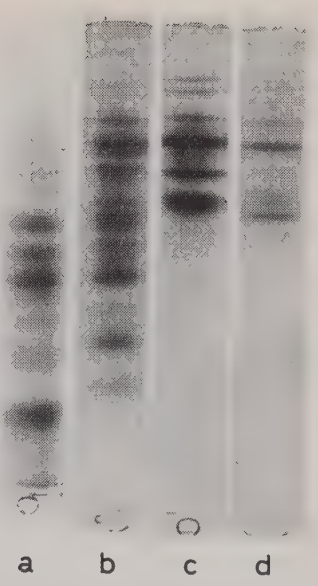


Abb. 18

Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit SDS.
Es wurden Fraktionen des QAE-Eluates (Abb. 17, a-d) der mit RNase behandelten Nicht-Histon Proteine vereinigt.
Die Elektrophorese wurde wie in Abb. 14 beschrieben durchgeführt.

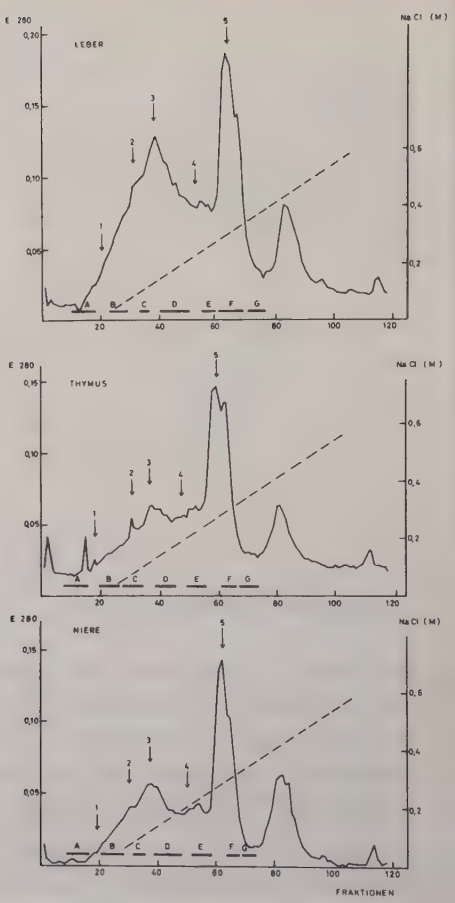
2.4.1. Nicht-Histon Proteine verschiedener Organe

Es wurde ein Vergleich der Nicht-Histon Proteine aus Chromatin von Leber, Thymus und Niere der Ratte durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Nicht-Histon Proteine eine organspezifische Verteilung zeigen. Die verschiedenen Schritte der Präparation und Fraktionierung waren identisch.

Wie man in Abb. 19 sehen kann, zeigten die Elutionsprofile der drei Präparationen Gemeinsamkeiten. Die Leberpräparation enthielt mehr Protein in den Bereichen 2 und 3 des Chromatogramms.

Abb. 19

Vergleichende Chromatographie der Nicht-Histon Proteine aus verschiedenen Rattenorganen.
Es wurden annähernd gleiche Mengen (ca. 20 mg) Nicht-Histon Proteine an QAE-Sephadex-A 25-Säulen (44 cm x 1,4 cm) gebunden. Die Elution wurde mit einem Kochsalzgradienten von 0,01 M - 0,60 M (100/100 ml) durchgeführt. Es wurden Fraktionen von 2 ml gesammelt.



2.4.2. Vergleichende Polyacrylamid-Gelelektrophoresen

Die weitere Analyse der verschiedenen Bereiche durch SDS-Polyacrylamidelektrophorese zeigte (Abb. 20), daß viele Banden allen drei Organen gemeinsam waren. Verschiedene Proteinkomponenten waren jedoch nur in jeweils einem Gewebe sichtbar. Die Unterschiede der Nicht-Histon Proteine zwischen den

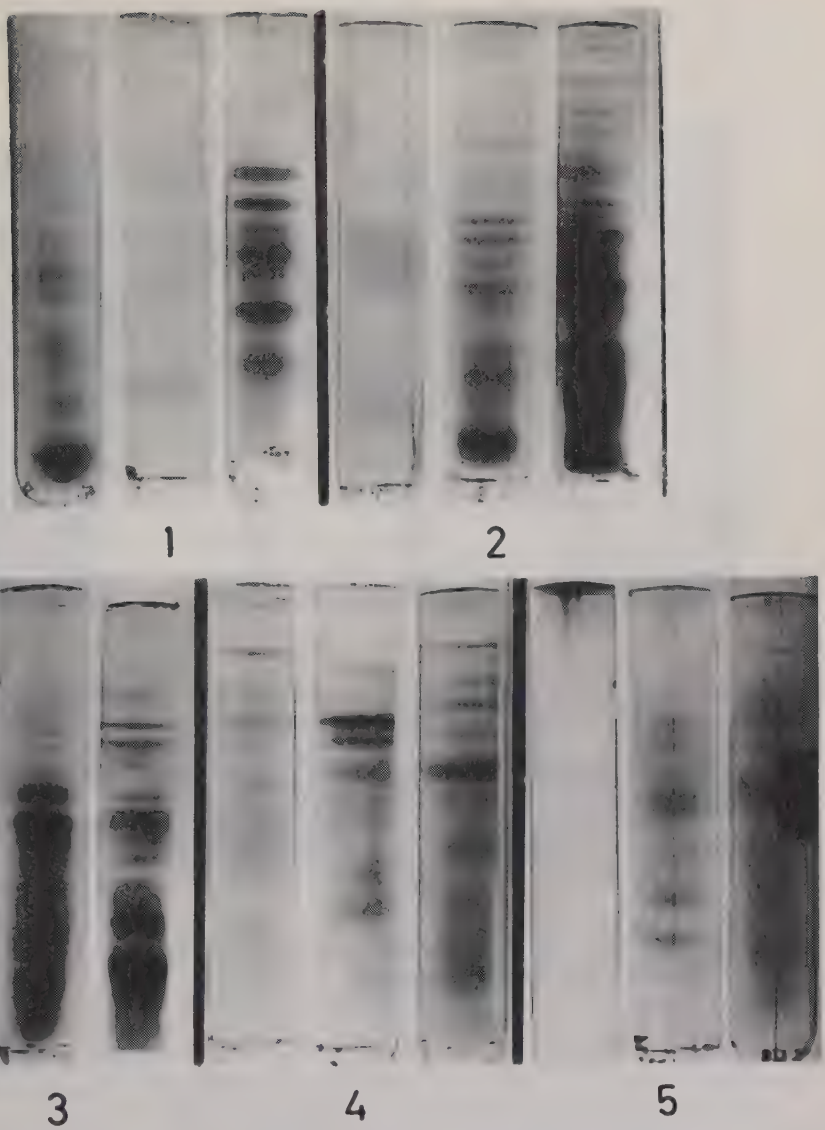


Abb. 20 Polyacrylamidgelelektrophorese mit SDS von Korrespondierenden Proteinfraktionen verschiedener Organe. Die in Abb.19 mit den Pfeilen gekennzeichneten Bereiche (1-5) der QAE-Sephadex-Eluate wurden jeweils vereinigt. Die Elektrophorese wurde wie in Abb.14 beschrieben, durchgeführt. Die Reihenfolge der entsprechenden Fraktionen ist von links nach rechts: Niere, Thymus und Leber.

verschiedenen Organen wurden deutlicher bei Durchführung von Elektrophoresen nach BENJAMIN und GELLHORN (Abb.21).

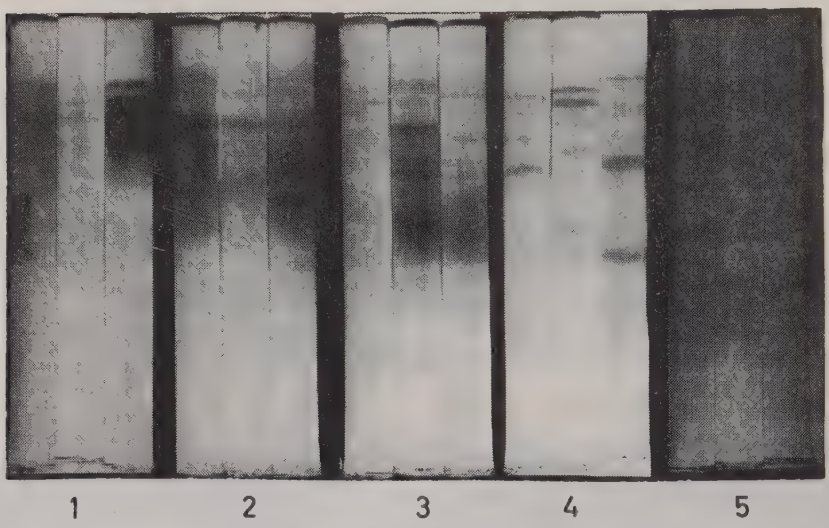


Abb. 21 Polyacrylamidgelelektrophorese nach BENJAMIN und GELLHORN (95) von korrespondierenden Proteinfraktionen verschiedener Organe.
Es wurden Bereiche der QAE-Sephadex-Eluate (Abb.19, 1-5) vereinigt. Die Elektrophorese wurde auf 10% Gelen bei pH 11,6 und 4 M Harnstoff durchgeführt. Die Richtung der Elektrophorese war von oben nach unten. Die Reihenfolge der korrespondierenden Fraktionen ist von links nach rechts: Niere, Thymus und Leber.

2.5. Thiol- und Phosphatgehalt

Weiterhin wurde der Thiol- und Phosphatgehalt der Proteinfraktionen (Tabelle 2 und Tabelle 3) bestimmt. Die Verteilung der SH-Gruppen war in den drei Präparationen sehr ähnlich, in den Leberproteinen wurden jedoch höhere SH-Werte (Tabelle 2) gefunden. Der Phosphatgehalt zeigte in der Leber- und Thymuspräparation eine ähnliche Verteilung. Die Nierenproteinfraktionen wiesen deutliche Unterschiede zu den zwei anderen Präparationen auf (Tabelle 3).

Tabelle 2: Thiol-Gehalt von QAE-Sephadex Fraktionen der Nicht-Histon Proteine.
Die Fraktionen der QAE-Sephadex-Chromatogramme (Abb. 19) wurden vereinigt (A-G). Der Thiol-Gehalt wurde durch Reaktion mit radioaktivem Jodacetat bestimmt. Der SH-Gehalt ist in µMole/10 g Protein angegeben.

FRAKTION	NIERE	THYMUS	LEBER
A	2	-	8
B	21	7	33
C	12	14	27
D	11	9	24
E	5	7	14
F	2	4	6
G	-	-	2

Tabelle 3: Phosphatgehalt von QAE-Sephadex Fraktionen der Nicht-Histon Proteine.
Die Fraktionen der QEA-Sephadex-Chromatogramme (Abb. 19) wurden vereinigt (A-G). Der Phosphatgehalt wurde nach Veraschen der Proben bestimmt. Die Werte sind in Gewichtsprozent angegeben.

FRAKTION	NIERE	THYMUS	LEBER
A	2.55	-	-
B	0.80	-	-
C	-	0.15	-
D	0.20	-	1.00
E	0.35	0.40	1.25
F	0.05	1.35	1.10
G	-	-	0.20

2.6. Relative Umsatzrate

Um den metabolischen Zustand der Nicht-Histon Proteine zu untersuchen, wurde Ratten radioaktive Aminosäure (Tyrosin) injiziert. Die höchste spezifische Radioaktivität wurde in den löslichen cytoplasmatischen Proteinen gefungen, gefolgt von den Nicht-Histon Proteinen und, mit dem geringsten Einbau, die Histone (Tabelle 4). Die Verteilung der Radioaktivität in den

Tabelle 4:

Radioaktive Markierung von Rattenleberproteinen nach Injektion von ^{3}H-Tyrosin. Zehn Ratten wurde radioaktives Tyrosin i.p. injiziert und nach einer Stunde wurde die Verteilung der Radioaktivität bestimmt. Die spezifische Aktivität der Proteine ist in Counts pro Minute und Milligramm angegeben.

FRAKTION		cpm/mg
Cytosol		19000
G 25-Filtrat		2900
Bio-Rex-Filtrat		4900
Histone		2700
DNP		12000
		-18000
QAE-Fraktion	a	2000
	b	10000
	c	7500
	d	5500
	e	2500

Nicht-Histon Proteinen war nicht gleichmäßig. Wie in Tabelle 4 deutlich wird, enthielten die verschiedenen Bereiche des QAE-Sephadex-Eluates Proteine mit sehr unterschiedlicher spezifischer Aktivität. In der Desoxyribonucleoprotein-Fraktion wurde ebenfalls Radioaktivität gefunden. Das beruhte auf dem Vorhandensein von 3-4 % der chromosomalen Proteine, die, fest an der DNA gebunden, mehr Tyrosin als die Nicht-Histon Proteine einbauten.

2.7. Transcription

Die Transcriptionen mit Polymerase aus Rattenleber führten zu anderen Ergebnissen als die mit E. coli-Polymerase. Während mit E. coli-Polymerase eine Stimulierung der Transcription durch Nicht-Histon Proteine, besonders bei Desoxyribonucleoprotein (DRNP) als Matrix , feststellbar war, konnte ein solcher Effekt mit Leber-Polymerase nicht gefunden werden. Es war eine Hemmung zu beobachten:

	Relative Matrizenaktivität			
	DNA	DNA+NHP	DRNP	DRNP+NHP
Rattenleber-Polymerase	385±50	316±40	340±50	319±40
E.coli-Polymerase	4230±150	4420±100	5850±500	7080±500

Bei Zugrundelegung des Mittelwertes aus sechs Meßreihen ergaben sich für die Rattenleber-Polymerase Hemmungen der Transcription durch die Nicht-Histon Proteine von 18 % bei DNA und 6 % bei Desoxyribonucleoprotein (DRNP) als Matrix. Die Stimulierung der Transcription mit E. coli-Polymerase durch Nicht-Histon Proteine betrug bei DNA 4 % und bei DRNP als Matrix 21 %. Die Ergebnisse zeigten, daß das nicht ganz deproteinisierte DRNP schon eine Hemmung von etwa 12 % gegenüber DNA als Matrix aufwies. Interessant war die Tatsache, daß DNA und DRNP durch die Nicht-Histon Proteine auf etwa den gleichen Wert gehemmt wurden.

IV. DISKUSSION

1. Freie Desoxyribonucleinsäure

Zur Aufklärung der Chromatinstruktur ist es notwendig, viele verschiedene Methoden anzuwenden. Die chemische Bausteinanalyse (41) zusammen mit Röntgenstrukturuntersuchungen (41-44) führte zu dem von WATSON und CRICK 1953 (44) vorgeschlagenen Modell der DNA-Doppelhelix (Abb.5), in der zwei Polynucleotidstränge schraubenartig umeinander gewunden sind. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde die fädige Struktur und der netzartige Aufbau des Chromatins deutlich (Abb. 22). Der hohe Gehalt an Protein konnte außer mit Bestimmungen im Gesamtchromatin (29) auch durch Färbemethoden direkt am Chromosom (33, 135) gezeigt werden. Die Bestimmung der Verteilung des Proteins an der DNA erscheint allerdings besonders schwierig und wird mit den unterschiedlichsten Techniken versucht. Alle beruhen auf dem Nachweis des DNA-Anteils, der im Chromatin frei vorliegt. Wie schon eingangs erwähnt, ließ sich durch thermische Denaturierung von Erbsenkeimlingschromatin (60) ein Wert von 4% hierfür ermitteln, in Transcriptionsstudien ist 10 bis 20% der Matrix aktiv (81.61-66), und Actinomycin D - Bindungsstudien (67) zeigten Werte um 33%. Die Bestimmungen mit Poly-Lysin beruhen auf der Bindung des Poly-Kations an die negativ geladenen Phosphatreste. Das Poly-Lysin bindet wahrscheinlich in der kleinen Grube der DNA-Helix (Abb. 23). Mit Poly-Lysin ergaben sich je nach Molekülgröße des Polykations Werte von 46% ($\overline{P}$: 6), 38% ($\overline{P}$: 37) (68) und in dieser Arbeit 32% ($\overline{P}$: 670) für freie DNA, wobei der von CLARK und FELSENFELD (58) gefundene Wert von 50% ($\overline{P}$: 670) nicht mit den anderen in Einklang ist. Ebenso stimmt der von ihnen durch DNase I-Verdauung ermittelte Teil an freier DNA von 50% nicht mit den von anderen gefundenen Werten überein. Aus Degradationskinetiken von MIRSKY (136) läßt sich berechnen, daß etwa 75% der DNA im Chromatin dem DNase-Angriff ebenso zur Verfügung stehen wie reine DNA. Der gleiche Wert wird von ITZHAKI (59) für mit Nuclease abbaubare DNA im Chromatin angegeben. In eigenen

Beobachtungen wurden ebenso Werte von 73 ± 12% gefunden.

Abb. 22 Elektronenoptische Darstellung von Chromatin nach BRAM und RIS (150)

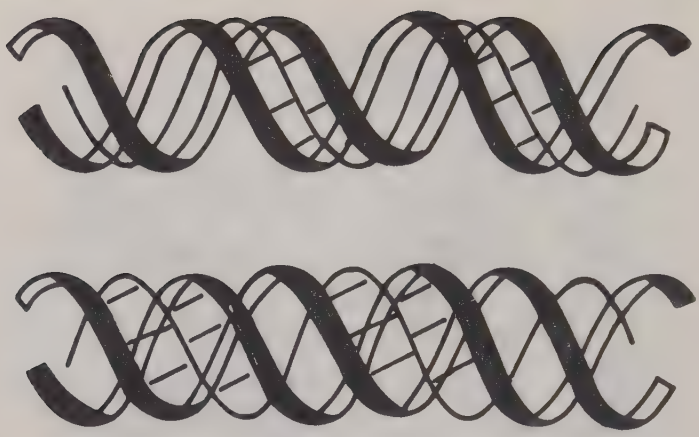


Abb. 23 DNA-Doppelhelix mit Bindung von Poly-Lysin in der kleinen (A) und Histon in der großen Grube (B)

Besonders die Diskrepanz zwischen den Werten aus Lysintitrationen und Nucleaseverdauung zeigt die Notwendigkeit, die Bezeichnung "freie DNA" zu differenzieren. Der Nucleaseverdauung sind anscheind Bereiche zugänglich, die der Titration mit hochmolekularem Poly-Lysin nicht offenstehen. Man kann vermuten, daß dies DNA-Strecken sind, die von Protein quasi überdacht sind, aber nicht mit Poly-Lysin in Wechselwirkung treten können. Während wie in III.1.2. dargestellt, Poly-Lysin-DNA-Komplexe nur zu 1-3% abgebaut werden (was von Stellen herrühren kann, an denen Poly-Lysin-Molekel zusammentreffen und die exakte Abschirmung der Phosphat-Reste gestört ist), können DNA-Histon-Rekombinate bis zu 65% degradiert werden. Es ist also eine Eigenschaft von DNA-Histonkomplexen von DNase I,zu einem bestimmten Teil abbaubar zu sein. Ungefähr den gleichen Wert findet man nach genauer Betrachtung bei Verdauung von Chromatin. Unter Annahme folgender Werte

75% DNA ist DNase verdaubar
32% DNA ist frei
und 75% - 32% gleich 43% DNA ist "überdacht",

kommt man zu dem entsprechenden Ergebnis; denn: 100% - 32% gleich 68% DNA sind proteinbedeckte DNA; der Anteil von "überdachter DNA" (= 43%) an der proteinbedeckten DNA (= 68%) ist 62%. DNA Histon Rekombinate können mit DNase bis zu 65% abgebaut werden. Der Vergleich beider Zahlen - 62% und 65% - zeigt die Ähnlichkeit von DNA-Histonrekombinaten mit den durch Poly-Lysin nicht titrierbaren Chromatin-Bereichen. Aus diesen Ergebnissen und Überlegungen geht hervor, daß man unter Verwendung von DNase I allein, wie es versucht wurde (58), die proteinbedeckte DNA nicht isolieren kann.

Die Differenz zwischen den aus Transcriptionen gefundenen Werten und Poly-Lysin- bzw. Actinomycin D-Bindungsstudien läßt sich durch spezifische Repression des verfügbaren Genoms erklären. Chromatin besitzt etwa 15 (±5)% der Matrizenaktivität von DNA. Dies würde bedeuten, daß ca. 32 % - 15(±5)% gleich 17(±5)% der freien DNA reprimiert wären. Die Hemmung der Transcription mit Rattenleber-Polymerase durch die entsprechenden Nicht-Histon Proteine ist, eingedenk der weiter unten erwähnten Einschränkungen, ungefähr 18%. Der Zusammenhang ist deutlich. Die Tatsache, daß mit zwei verschiedenen Methoden ähnliche Werte gefunden wurden, ist eine Stütze für die Annahme eines repressiven Regelmechanismus in höheren Organismen. Die dargelegten Überlegungen lassen sich in einem Modell zusammenfassend darstellen (Abb. 24).

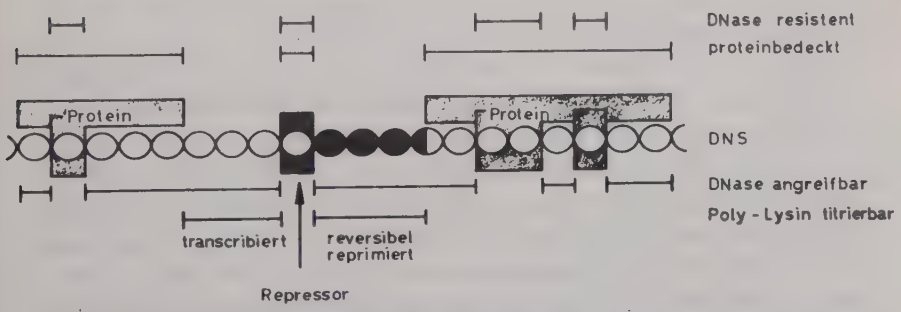


Abb. 24 Modell zur Chromatinstruktur. - Es ist die Verteilung der chromosomalen Proteine (ohne Unterscheidung zwischen Histonen und Nicht-Histon Proteinen) unterschiedlicher Bindungsart an der DNA-Helix und die freie DNA mit dem transcribierten Anteil dargestellt.

Der von LI und BONNER (60) ermittelte Wert von 4% für freie DNA im Chromatin ist möglicherweise damit zu erklären, daß die DNA in "Supercoils" vorliegt (137,138) und so von Protein effektiv nicht-beeinflußte DNA-Strecken kaum vorliegen.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der "freien DNA" wurde mit Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten durchgeführt. Die Absolutmethode brachte andere Ergebnisse als die Größenbestimmung relativ zu SV 40-DNA. Die mit SV 40-DNA als Eichsubstanz gewonnene Größe ist wahrscheinlich die besser gesicherte. Native DNA eines mittleren Molekulargewichtes von $7{,}4 \times 10^5$ würde einer DNA-Kette von ca. 1200 Nucleotidpaaren entsprechen (= 0,4 μ). DNA dieser Größe könnte für ein Protein eines Molekulargewichtes von etwa 40 000 codieren; mit DNA, die größer als 9,4 S ist, wäre auch die Codierung für Proteine mit Molekulargewichten von über 60 000 möglich. Es muß bei diesen Größenangaben bedacht werden, daß z.B. durch Polymerase-Moleküle an Strecken freier DNA mit den verwendeten Methoden am Ende eine Zerkleinerung der DNA herbeigeführt wird. Ebenso gibt es durch die nicht vollkommene Abschirmung mit Poly-Lysin, 1-3% von DNA-Poly-Lysin Komplexen werden abgebaut, eine Verringerung der Kettenlänge der freien DNA. Deswegen sind die hier gefundenen Werte Mindestgrößen.

Beim Vergleich der "freien DNA" mit der wahrscheinlichen Größe der repetitiven Sequenzen, eines wesentlichen Teiles der DNA, wird deutlich, daß mit der angewandten Isolierungstechnik diese DNA einer mittleren Größe von 200 Nucleotidpaaren (45) hiermit nicht angereichert wird. Mit den Renaturierungsexperimenten wird das gleiche unterstrichen. In diesem Bezug stellt die freie DNA einen repräsentativen Teil der Gesamt-DNA dar. Die von CLARK und FELSENFELD (58) isolierten Teile der proteinbedeckten DNA hatten eine mittlere Größe von ca. 175 Basenpaaren, was der mittleren Größe der repetitiven Sequenzen nahe kommt. Renaturierungsexperimente erwiesen jedoch ebenfalls, daß zwischen der betreffenden DNA und der Gesamt-DNA kein Unterschied bestand. Zu der Frage der Existenz und Größe freier DNA-Strecken sind auch Betrachtungen an elektronenmikroskopischen Aufnahmen möglich. Nach HENNING (139) gibt es

in gespreiteten Y-Chromosomen mehrere Mikron lange freie DNA-Strecken, die DNA von mehreren Millionen Dalton entsprechen würde.

In der Absicht, die Überlegungen zur Funktion der freien DNA zu unterstreichen, wurde die Verteilung von in vivo schnellmarkierter RNA im Präparationsgang verfolt. Der überwiegende Teil (ca. 50%) ließ sich durch Proteolyse aus dem Komplex herauslösen. Ein Teil hiervon ist vermutlich die RNA, die an Polymerase gebunden ist. Der Rest kann aus den Ribonucleoproteinpartikeln (137) stammen. Dies berührt wahrscheinlich Abbau und Transport der heterogenen RNA, worüber in vielen anderen Arbeiten berichtet wird (140.141). Bei Betrachtung der weiteren Ergebnisse zeigt sich, daß an den 68% mit DNase verdaubarer DNA nur etwa 1/4 der übrigen RNA vorlagen, während zusammen mit der Poly-Lysin-bedeckten freien DNA (= 32%) 3/4 der restlichen RNA erhalten würden. Dies verdeutlicht die metabolische Aktivität der freien DNA.

Die ersten Ergebnisse aus Transcriptionen mit freier DNA sind von besonderem Interesse. Diese DNA-Bereiche zeigen mit Leber-B-Polymerase eine höhere Matrizenaktivität als Gesamt-DNA. Es kamen zwei Störmöglichkeiten mit derselben Wirkung in Betracht. Wenn die freie DNA weitgehend einzelsträngig vorgelegen hätte, wäre derselbe Effekt aufgetreten. Durch Messung der Hyperchromizität konnte dies ausgeschlossen werden. Bei Gesamt-DNA führte thermische Denaturierung zu einem Anstieg der Extinktion auf 149±0,5% des Ausgangswertes. Der gleiche Wert wurde mit freier DNA gefunden.
Durch Brüche oder Verkürzung der DNA-Helix kommt es ebenfalls zu einem Anstieg der Transcription mit B-Polymerase. Ein Vergleich mit beschallter Gesamt-DNA machte deutlich, daß auch eine solche Veränderung der Matrix nicht den beobachteten Effekt mit freier DNA erklären kann. Das umgekehrte Resultat mit E. coli-Polymerase macht wieder deutlich, welche entscheidende Bedeutung die Verwendung einer dem sonstigen Versuchssystem homologen Polymerase hat.
Bei dem jetzigen Informationsstand ist die Annahme berechtigt, daß in der isolierten DNA ein Teil des Genoms abgetrennt wurde,

der besser transcribierbar ist als andere Bereiche. Es kann vermutet werden, daß diese Strecken reicher an Initiationsstellen sind als der Durchschnitt der DNA. Mit Untersuchungen der Hemmbarkeit der Transcription an freier DNA durch Nicht-Histon Proteine und Vergleich mit Gesamt-DNA wird vielleicht eine Antwort auf diese Frage möglich werden.

Die Feststellung großer Bereiche nicht proteinbedeckter DNA erfüllt eine der Hauptforderungen von Vorstellungen zur Genregulation, wobei die Gene direkt durch Protein-DNA Wechselwirkung aktiviert bzw. inaktiviert werden (80-82.99.113). Andere Überlegungen hierzu gehen von der Annahme aus, daß die DNA gleichmäßig von Protein bedeckt sei und die Transcription hieran noch ablaufen könne (142). Die Inaktivierung des Genoms erfolge in diesem Fall durch Faltung des Nucleoproteinfadens zu "Supercoils" (137.138), die durch Protein-Protein-Interaktion fixiert sein sollen. Die zweitgenannte Vorstellung wird durch die hier beschriebenen Ergebnisse nicht unterstützt, kann aber auch nicht ausgeschlossen werden.

2. Nicht-Histon Proteine

Die beschriebene Methode zur Isolierung der Nicht-Histone Proteine benutzte ein von PAUL und GILMOUR angewandtes Extraktionsverfahren (99). Die DNA, an der auch noch nach Extraktion geringe Mengen Protein anhafteten, wurde quantitativ abzentrifugiert. Dies war eine Voraussetzung für den Erfolg der ganzen Präparation. Ein weiterer wichtiger Schritt war die Entfernung der Histone durch Absorption an Bio-Rex 70, was zu einer Nicht-Histon Proteinfraktion führte, die überhaupt keine Histone enthielt. Schon Spuren von Histonen hätten zu Aggregationen und zur Präzipitation mit Nicht-Histon Proteinen geführt. Die Löslichkeit der gewonnenen Proteine auch in verdünnten wäßrigen Medien war einer der Hauptvorteile dieser Methode.

Durch Chromatographie an QAE-Sephadex-A 25 ließen sich die Nicht-Histon Proteine in verschiedene gut reproduzierbare Fraktionen auftrennen. Die Fraktionierung ist leicht durchführbar und wegen der Reproduzierbarkeit kann diese Methode dem Versuch dienen, eine systematische Klassifizierung der Nicht-Histon Proteine durchzuführen.
Die weitere Analyse der verschiedenen QAE-Sephadex Fraktionen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte die große Vielfalt dieser Proteine. Die Möglichkeit, daß die Heterogenität der Nicht-Histon Proteine auf Degradation beruht, wurde durch die Ergebnisse der Dinitrophenylierungsversuche nach SANGER (130) weitgehend ausgeschlossen. Der Anteil von RNA, der besonders deutlich wurde durch die hohen O.D. 260/280 Quotienten, war ebenfalls nicht der Grund der Heterogenität, denn durch RNase-Behandlung wurde diese Vielfalt sowohl im chromatographischen als auch im elektrophoretischen Verhalten nicht vermindert.

Aus den Ergebnissen von WANG (106), LANGAN (103) und KLEINSMITH (143) ist bekannt, daß ein Teil dieser Proteine erhebliche Mengen Phosphat enthält. Die Arbeiten von STOCKEN und ORD (144) haben die Aufmerksamkeit auf das Vorkommen von Thiolgruppen in diesen Proteinen gelenkt.Deswegen wurde der Phosphat- und Thiogehalt in den verschiedenen Bereichen der QAE-Sephadex-Chromatogramme bestimmt. Es ist interessant, daß die Proteine mit hohem Phosphatgehalt nur wenig SH-Gruppen enthielten und umgekehrt. Diese unterschiedliche Verteilung von Thiol- und Phosphatgruppen war im allgemeinen in den Präparationen aus Leber, Thymus und Niere gleich. Wegen der möglichen Bedeutung der Phosphoproteine (143) und des Thiol/Disulfidverhältnisses (122.145) bei der Kontrolle der Genaktivität ist die Kenntnis des Gehalts von Phosphat- und Thiolgruppen in den verschiedenen Fraktionen der Nicht-Histon Proteine von Interesse.

Die hohe spezifische Aktivität der Desoxyribonucleoprotein (DRNP)-Fraktion nach Verabreichung radioaktiver Aminosäure lenkte die Aufmerksamkeit auf einen besonderen Teil der chromosomalen Proteine. Es waren etwa 3-4% der Proteine im Chroma-

tin, die nicht mit der beschriebenen Extraktionsweise ablösbar waren und die bedeutend mehr radioaktive Aminosäure einbauten als die Nicht-Histon Proteine. HOLOUBEK und CROCKER (108) berichteten ebenso von hochmarkierbaren Proteinen, die fest an die DNA gebunden sind. Die Existenz von Proteinen, die nicht aus dem Chromatin extrahierbar sind, ist eine Voraussetzung für ein von TAYLOR (146) vorgeschlagenes Modell, worin die Chromosomen aus Strecken relativ kurzer DNA-Helices bestehen, die über Proteinbrücken miteinander verknüpft sind (Abb. 25).

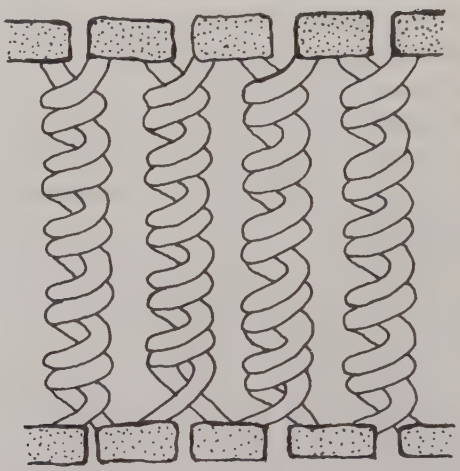


Abb. 25
Chromosomenmodell
nach TAYLOR (146)

Nach vergeblichen Versuchen, Chromosomen mit proteolytischen Enzymen zu spalten (147.148), finden sich in neuer Zeit experimentelle Hinweise (149), die eine Verknüpfung kürzerer DNA-Strecken zu der hochmolekularen DNA wahrscheinlicher machen. Zusammen mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen (150), die als Durchmesser der gestreckten Chromosomen eine der Doppelhelix entsprechende Größe ermitteln, und dem Befund der nicht extrahierbaren chromosomalen Proteine, wie es hier beschrieben wurde, ergäbe sich möglicherweise das in Abb. 26 dargestellte Bild.

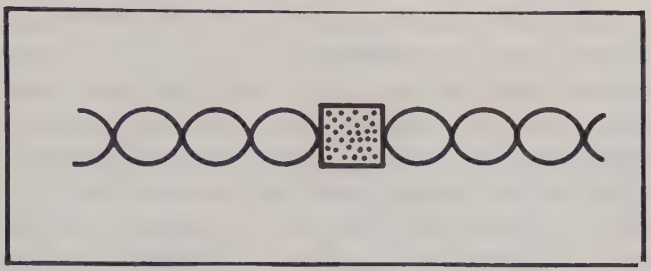


Abb. 26 DNA-Helices im Chromosom verknüpft durch Proteinbrücken

Die Arbeiten von PAUL und GILMOUR haben die Aufmerksamkeit auf die Nicht-Histon Proteine als mögliche Derepressoren gelenkt (62.99.113.151). Es war deshalb interessant, diese Proteine aus unterschiedlichen Organen zu vergleichen. Die chromatographischen Profile der Nicht-Histon Proteine aus Leber, Thymus und Niere der Ratte waren sehr ähnlich mit geringen qualitativen und quantitativen Unterschieden. Die weitere Untersuchung durch Acrylamidgelelektrophoresen nach SHAPIRO et al. (132) und nach BENJAMIN und GELLHORN (95) zeigte das Vorkommen von spezifischen Banden neben großen Ähnlichkeiten in den elektrophoretischen Bandenmustern in allen Protein-Fraktionen der untersuchten Organe. Die Tatsache, daß die Unterschiede zwischen den Organen durch die Elektrophorese nach BENJAMIN und GELLHORN deutlicher wurden, kann darauf beruhen, daß im Gegensatz zu den Proben mit SDS hier teilweise die Quartärstruktur erhalten war. Die Ergebnisse stimmen mit denen von LOEB und CREUZET (152) und von DASTUGUE et al. (153) überein. ELGIN und BONNER (30) haben teilweise das gleiche gefunden, während MAC GILLIVRAY et al. (154) zu einem anderen Resultat gelangt waren. Ob diese Variabilität mit dem Funktionszustand im Sinne spezifischer Transcription zusammenhängt, bleibt noch zu untersuchen. Bei Betrachtung der Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten zwischen den Nicht-Histon Proteinen

aus den verschiedenen Organen muß bedacht werden, daß viele Enzyme fest an das Chromatin gebunden sind, wie z.B. DNA- (155) und RNA-Polymerase (156), die Nucleosid Triphosphatasen (147), die Histon Acetylasen (158.159) und -Methylasen (160), Nicht-Histon Protein Phosphokinasen (161.162) ebenso wie dephosphorylierende Enzyme. Was Histon Transacetylasen betrifft, so wurden hierfür Unterschiede im Verhalten zwischen den Enzymen aus Leber, Thymus und Niere der Ratte an DEAE-Cellulose aufgezeigt, so daß Heterogenität dieser Art ebenfalls berücksichtigt werden muß (163).

Die relativ hohen Schwankungen der Transcriptionsergebnisse machten eine quantitative Aussage unsicher. Es konnte aber deutlich die hemmende Wirkung der Nicht-Histon Proteine auf die Aktivität verschiedener Matrizen bei Verwendung der homologen DNA-abhängigen RNA-Polymerase gezeigt werden. Im Zusammenhang mit Überlegungen zum Funktionieren des genetischen Apparates würden diese Ergebnisse einen repressiven Mechanismus wahrscheinlich machen.
Der Vergleich von gereinigterDNA mit dem stark extrahierten Desoxyribonucleoprotein als Matrix ist weiterhin interessant. Beide Matrizen werden durch Nicht-Histon Proteine auf den gleichen Wert reprimiert, wobei Desoxyribonucleoprotein von vornherein eine geringe Hemmung gegenüber DNA aufweist. Die Hemmung der Transcription, welche durch die erwähnten 3-4% Restprotein erreicht wird, wirkt nicht zusätzlich zu der Repression durch die Nicht-Histon Proteine. Man könnte hieraus vermuten, daß für die Repressoren aus einem Gewebe nur eine begrenzte Zahl von Bindungsstellen zur Verfügung stehen. Es bleibt hierbei die Frage offen, warum einige Nicht-Histon Proteine eine spezifische Repression, die von den schwerextrahierbaren Restproteinen erreicht wird, ebenfalls bewirken könnten. Die Ergebnisse mit Polymerase von E. coli zeigten keine Hemmung der Transcription durch Nicht-Histon Proteine; das Gegenteil ist der Fall. Es wird eine Stimulierung der RNA-Synthese deutlich, besonders stark bei Desoxyribonucleinprotein als Matrix. Diese Befunde sind von besonderem Interesse im Zusammenhang mit den Ergebnissen von TENG ,TENG und ALLFREY

(102), die unter Verwendung von E. coli-Polymerase durch Nicht-Histon Proteine eine Stimulierung der Transcription von mindestens 72% beobachteten und hieraus eine Induktionswirkung dieser Proteine ableiteten. Aus den ersichtlichen Differenzen wird deutlich, daß es von Bedeutung ist, welche Polymerase für Transcriptionsstudien benutzt wird. Bei Verwendung von E. coli-Polymerase im Transcriptionstest wurde also sowohl mit DNA-NHP Rekombinaten als auch mit freier DNA im Vergleich zu Gesamt-DNA als Matrix ein gegenteiliger Effekt als mit Rattenleber-Polymerase festgestellt. Nach diesen und den Ergebnissen von BUTTERWORTH et al. (164) liegt die Vermutung nahe, daß Transcriptionen mit der zur Matrix homologen Polymerase die Vorgänge in vivo wirklichkeitsgetreuer wiedergeben. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich notwendig, die Versuche von PAUL und GILMOUR (97.99) ebenso wie die von HUANG und HUANG (82) und von BEKHOR et al. (81) mit den homologen Polymerasen zu wiederholen.

Eine Voraussetzung zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Nicht-Histon Proteine ist, zum Beispiel neben der Verwendung der homologen Polymerase, das Vorhandensein genügender Mengen definierter Nicht-Histon Protein Fraktionen in verdünnter wäßriger Lösung. Die beschriebene Isolierungsmethode kann als ein erster Schritt zu diesem Ziel angesehen werden.

Nach der Erarbeitung von geeigneten Methoden zur Gewinnung von Nicht-Histon Proteinen ist zu erwarten, daß auch in vermehrtem Maß diese Gruppe von Proteinen untersucht wird. Die Erstellung von geeigneten Systemen zur Prüfung ihrer funktionellen Aktivität ist die große Schwierigkeit bei der weiteren Untersuchung der Nicht-Histon Proteine. Die Fraktionierung der DNA in Bereiche, die möglicherweise einer spezifischen Repression in verstärktem Maße zugänglich sind, ist ein Beitrag in dieser Sache. Dieses System bestehend aus Nicht-Histon Proteinen - DNA Fraktionen - homologer Polymerase und gegebenenfalls Hormonen könnte weiterhin dazu dienen, die Möglichkeit eines repressiven Regulationsmechanismus in höheren Organismen aufzuzeigen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Chromatins gliedern sich in zwei Teile. Zum einen wurde versucht, aus dem Gerüst des Chromatins - der DNA - besondere Bereiche - die "freie DNA" - herauszulösen, zu isolieren und zu charakterisieren. Auf der anderen Seite war es das Ziel, die chromosomalen Nicht-Histon Proteine in ihrer Gesamtheit aus dem Chromatin zu extrahieren und ihre Eigenschaften zu untersuchen.

1. Freie Desoxyribonucleinsäure

Die im Chromatin nicht von Protein bedeckten DNA-Bereiche wurden durch Bindung von Poly-Lysin hieran bestimmt. Der so titrierbare Teil der Phosphatgruppen im Chromatin ist 32%.

Die Isolierung der "freien DNA" basierte auf der Tatsache,daß DNA-Poly-Lysin-Komplexe von DNase I nicht abgebaut werden. So wurde nach Bedeckung der "freien DNA" mit Poly-D-Lysin und Entfernung der chromosomalen Proteine durch Pronaseverdauung die freigelegte DNA mit DNase I hydrolysiert. Die durch Poly-D-Lysin geschützte "freie DNA" wurde in 2 M NaCl freigesetzt und durch Bindung an Hydroxyapatit vom Poly-Lysin abgetrennt.

Die Molekulargewichtsbestimmung der "freien DNA" mit Sedimentationsgeschwindigkeitsmessungen in Sucrosegradienten ergab einen mittleren Wert von $0{,}74 \cdot 10^6$.

Renaturierungsexperimente zeigten, daß in der "freien DNA" keine repetitiven Sequenzen angereichert waren. Sie stellte in diesem Zusammenhang einen repräsentativen Anteil der Gesamt-DNA dar.

Die metabolische Aktivität der "freien DNA" wurde mit der Untersuchung der schnellmarkierbaren RNA im Präparationsgang der "freien DNA" deutlich. An den 32% der "freien DNA" befand sich etwa 3/4 der gesamten DNA-gebundenen RNA.

Dieses Ergebnis wurde ergänzt durch die Transcriptionsuntersuchungen mit "freier DNA" im Vergleich zu Gesamt-DNA. Hierbei zeigte "freie DNA" mit Rattenleber-B-Polymerase eine

höhere Matrizenaktivität als Gesamt-DNA.

Der Nachweis freier DNA-Bereiche unterstützt die Vorstellung zur Genregulation durch direkte Protein-DNA Wechselwirkung im Gegensatz zu Regulationsmöglichkeiten durch "Supercoil" Bildung.

2. Nicht-Histon Proteine

Die chromosomalen Proteine wurden in 2 M NaCl - 5 M Harnstoff in Lösung gebracht. Nach Abtrennung der DNA durch Ultrazentrifugation gelang es, die Histone ohne irgendwelche Präzipitationen von den Nicht-Histon Proteinen durch Bindung an Bio-Rex 70 abzutrennen. Die Nicht-Histon Proteine konnten anschließend gut reproduzierbar an QAE-Sephadex-A 25 aufgetrennt werden.

Die Heterogenität dieser Proteine wurde aus den Elutionsprofilen an QAE-Sephadex-A 25 deutlich. Besonders klar wurde dieser Befund mit Gelelektrophoresen. Eine Behandlung mit RNase erwies, daß die Heterogenität der Nicht-Histon Proteine nicht auf dem Gehalt von RNA beruht. Es wurde auch ausgeschlossen, daß das heterogene Bild durch Degradation hervorgerufen wird.

Bei einem Vergleich der Nicht-Histon Proteine aus verschiedenen Organen der Ratte - Niere, Thymus und Leber - waren mit Polyacrylamid-Gelelektrophoresen neben vielen gemeinsamen Komponenten auch organspezifische Proteine feststellbar. Dieser Befund erfüllt eine der Hauptforderungen der Annahme, daß die Nicht-Histon Proteine die Feinregulation des Genoms ausführen.

Die Bestimmung des Thiol- und Phosphatgehalts der Nicht-Histon Proteine ergab, daß die Proteine mit hohem Phosphatgehalt nur wenig SH-Gruppen enthielten und umgekehrt. Diese Unterschiede eröffnen die Möglichkeit der Modifikation ganzer Proteingruppen, was für die regulative Funktion der Nicht-Histon Proteine von Bedeutung sein kann.

Die relative Umsatzrate der chromosomalen Proteine wurde durch Verabreichung von radioaktivem Tyrosin ermittelt. Sie war bei

den Nicht-Histon Proteinen im Vergleich zu den Histonen sehr hoch. In einzelnen Fraktionen stieg die Umsatzrate bis auf den vierfachen Wert der Histone an.

Die Transcriptionsstudien an DNA-NHP-Rekombinaten mit Rattenleber-B-Polymerase haben den interessantesten Befund erbracht. Im Vergleich zu DNA als Matrix wiesen die Rekombinate eine Hemmung bis zu 18% auf. Zwanglos ergibt sich hieraus der Schluß, daß die isolierten chromosomalen Nicht-Histon Proteine Repressoren enthalten.

Die Hemmbarkeit der DNA-Matrix durch Nicht-Histon Proteine ist eine Stütze für die Annahme eines repressiven Regelmechanismus in höheren Organismen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1 D.E.Green, R.F.Goldberger: Molecular Insights into the Living Process, Academic Press, New York, 1967, S.306.

2 T.W.Rall, E.W.Sutherland, J.Biol.Chem. 232 (1958) 1065.

3 R.S.Makman, E.W.Sutherland, J.Biol.Chem. 240 (1965) 1309.

4 E.W.Sutherland, J.Amer.Med.Assoc. 214 (1970) 1281.

5 P.Karlson, Persp.Biol.Med. 6 (1963) 203.

6 B.N.Ames, R.G.Martin, Ann.Rev.Biochem. 33 (1964) 235.

7 C.E.Sekeris, P.Karlson: Mechanisms of Hormone Action, Thieme Verlag, Stuttgart, 1965, S.149.

8 H.L.Kornberg, Symp.Soc.Gen.Microbiol. 15 (1965) 8.

9 P.Karlson: Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Thieme Verlag, Stuttgart.

10 L.F.Congote, C.E.Sekeris, P.Karlson, Z.Naturf. 25 (1970) 279.

11 C.E.Sekeris, Excerpta Med. - Internat.Congress Ser. Nr. 184; Progress in Endocrinology, Proc. of the Third Internat.Congress of Endocrinology, Maxico, 1968, S.7.

12 H.J.Rogers in "The Biological Basis of Medicine" (von E.E. Bittar und N.Bittar), Academic Press, New York, 1963, Bd.2, S.421.

13 M.Beato, W.Brändle, D.Biesewig, C.E.Sekeris, Biochim.Biophys.Acta 208 (1970) 125.

14 M.E.Dahmus, J.Bonner, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 54 (1965) 1370.

15 F.Jacob, J.Monod, J.Mol.Biol. 3 (1961) 318.

16 A.D.Riggs, R.F.Newby, S.Bourgeis, J.Mol.Biol. 51 (1970) 353.

17 R.R.Burgess, A.A.Travers, J.J.Dunn, E.K.Nautz, Nature 221 (1969) 43.

18 R.Knippers: Molekulare Genetik, Thieme Verlag, Stuttgart, 1971.

19 W.Gilbert, B.Muller-Hill, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 58 (1967) 2415.

20 W.S.Resnikoff, J.H.Miller, J.G.Scaife, J.R.Beckwith, J.Mol.Biol. 43 (1969) 201.

21 P.Margolin, R.Bauerle, Cold Spr.Harb.Symp.quant.Biol. 29 (1966) 311

22 E.Englesberg, D.E.Sheppard, C.Squires, F.Jr.Mesonk, J.Mol.Biol. 43 (1969) 281.

23 J.Power, Genetics 55 (1967) 557.

24 M.Schwartz, Ann.Inst.Pasteur 113 (1967).

25 A.Ahmed, M.E.Case, N.Giles, Brookhaven Natl.Lab.Symp. 17, Subunit Structure of Proteins: Biochemical and Genetic Aspects, 53 (1964).

26 P.Karlson, Dtsch.Med.Wschr. 86 (1961) 668.

27 P.Karlson, C.E.Sekeris, Acta Endocrinol. 53 (1966) 505.

28 W.Flemming, Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung (Vogel, Leipzig, 1882), S.92,129,374.

29 J.Bonner, M.Dahmus, D.Fambrough, R.C.Huang, K.Marushige und D.Tuan, Science 159 (1968) 47.

30 S.C.R.Elgin, J.Bonner, Biochemistry (1970) 4440.

31 K.Marushige, H.Ozaki, Develop.Biol. 16 (1967) 474.

32 C.S.Teng, T.H.Hamilton, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 63 (1969) 465.

33 T.K.H.Holt, Chromosoma 32 (1970) 64.

34 K.Scherrer, G.Spohr, N.Branboulan, C.Morel, J.Grosclaude, C.Chezzi, Cold Spr.Harb.Symp.quant.Biol. 35 (1970) 539.

35 J.E.Mayfield, J.Bonner, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.68 (1971) 2652.

36 F.Szeszak, A.Pihl, Fed.Eur.Biochem.Soc.Lett. 20 (1972) 177.

37 H.W.v.Heyden, H.G.Zachau, Biochim.Biophys.Acta 232 (1971) 651.

38 M.Artmann, J.S.Roth, J.Mol.Biol. 60 (1971) 291.

39 S.Zamenhof, G.Brawerman, E.Chargaff, Biochim.Biophys.Acta 9 (1952) 402.

40 G.Wyatt, J.Gen.Physiol. 36 (1952) 201.

41 E.Chargaff, J.N.Davidson: The Nucleic Acids I, Acad.Press, New York, 1955.

42 W.T.Astbury, Symp. Nr.1, Soc.Exp.Biol. 66 (1947).

43 L.Pauling, R.B.Corey, Nature 171 (1953) 346.

44 J.D.Watson, F.H.C.Crick, Nature 171 (1953) 737 und 964.

45 R.J.Britten, D.E.Kohne, Science 161 (1968) 529.

46 K.A.Walsh, H.Neurath, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 52 (1964) 884.

47 K.Brew, F.C.Vanaman, R.L.Hill, J.Biol.Chem. 242(1967) 3747.

48 F.Ritossa, K.Atwood, D.Lindsley, S.Spiegelman, Nat.Cancer Inst.Monogr. 23 (1966) 449.

49 H.Wallace, M.Birstiel, Biochim.Biophys.Acta 114 (1966) 296.

50 R.J.Britten, E.H.Davidson, Science 165 (1969) 349.

51 V.C.Littau, V.G.Allfrey, J.H.Frenster, A.E.Mirsky, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 52 (1964) 93.

52 S.W.Brown, U.Wur, Science 145 (1964) 130.

53 J.H.Frenster, Nature 206 (1965) 680.

54 N.Granboulan, P.Granboulan, Exp.Cell Res. 38 (1965) 604.

55 V.G.Allfrey, V.C.Littau, A.E.Mirsky, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 49 (1963) 414.

56 Y.Kurashina, Y.Ohba, D.Mizuno, J.Biochem. 67 (1970) 661.

57 F.Klein, J.A.Szirmai, Biochim.Biophys.Acta 72 (1963) 48.

58 R.J.Clark, G.Felsenfeld, Nature 229 (1971) 101.

59 R.F.Itzhaki, Biochem.J. 125 (1971) 221.

60 H.Li, J.Bonner, Biochemistry 10 (1971) 1461.

61 M.Beato, K.H.Seifart, C.E.Sekeris, Arch.Biochem.Biophys. 138 (1970) 272.

62 J.Paul, R.S.Gilmour, J.Mol.Biol. 16 (1966) 242.

63 K.Marushige, J.Bonner, J.Mol.Biol. 15 (1966) 160.

64 M.Melli, J.O.Bishop, J.Mol.Biol. 40 (1969) 117.

65 K.D.Smith, R.B.Church, B.J.MacCarthy, Biochemistry 8 (1969) 4271.

66 C.H.Tan, M.Miyagi, J.Mol.Biol. 50 (1970) 641.

67 L.Kleiman, R.C.C.Huang, J.Mol.Biol. 55 (1971) 503.

68 R.F.Itzhaki, Biochem.J. 122 (1971) 583.

69 W.G.Yasmineh, J.J.Yunis, Biochem.Biophys.Res.Commun. 35 (1969) 779.

70 J.D.Duerksen, B.J.MacCarthy, Biochemistry 10 (1971) 1471.

71 K.Marushige, J.Bonner, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 68 (1971) 2941.

72 K.Murray, J.Mol.Biol. 39 (1969) 628.

73 E.Stedman, E.Stedman, Nature 153 (1944) 500.

74 R.H.Stellwagen, R.D.Cole, Ann.Rev.Biochem. 38 (1969) 951.

75 R.J.DeLange, E.L.Smith, Ann.Rev.Biochem. 40 (1971) 279.

76 R.J.DeLange, D.M.Fambrough, E.L.Smith, J.Bonner, J.Biol.Chem. 244 (1969) 319 und 5669.

77K.Iwai, K.Ishikawa, H.Hayashi, Nature 226 (1970) 1056.

78 R.J.DeLange, J.A.Hooper, E.L.Smith, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 69 (1972) 882.

79 R.C.C.Huang, J.Bonner, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 54 (1962) 960.

80 J.Bonner, M.E.Dahmus, D.M.Fambrough, R.C.Huang, K.Marushige, D.Y.Tuan, Science 159 (1968) 47.

81 I.Bekhor, G.M.Kung, J.Bonner, J.Mol.Biol. 39 (1969) 351.

82 R.C.C.Huang, P.C.Huang, J.Mol.Biol. 39 (1969) 365.

83 L.Kleinsmith, V.G.Allfrey, A.E.Mirsky, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 55 (1966) 1182.

84 W.S.Stevely, L.A.Stocken, Biochem.J. 100 (1966) 20.

85 V.G.Allfrey, R.Faulkner, A.E.Mirsky, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S. 51 (1964) 786.

86 S.Kim, W.K.Paik, J.Biol.Chem. 240 (1965) 4629.

87 B.G.Pogo, A.O.Pogo, V.G.Allfrey, A.E.Mirsky, Proc.Nat. Acad.Sci.U.S. 59 (1968) 1337.

88 D.M.Fambrough, F.Fujimura, J.Bonner, Biochemistry 7 (1968) 575

89 J.M.Jr.Kinkade, J.Biol.Chem. 244 (1969) 3375.

90 R.J.DeLange, D.M.Fambrough. F.J.Smith, J.Bonner, J.Biol.Chem. 243 (1968) 5906.

91 S.Panyim, R.Chalkley, J.Biol.Chem. 246 (1971) 7557.

92 J.E.Hearst, M.Botchan, Ann.Rev.Biochem. 39 (1970) 151.

93 A.E.Mirsky, A.W.Pollister, J.Gen.Physiol. 30 (1946) 117.

94 H.Busch: Histones and Other Nuclear Proteins, Academic Press, New York, 1965.

95 W.Benjamin, A.Gellhorn, Prov.Nat.Acad.Sci.U.S. 59 (1968) 262.

96 G.Patel, T.Y.Wang, Life Sci. 4 (1965) 1481.

97 T.Shirey, R.C.Huang, Biochemistry 8 (1969) 4138.

98 T.Y.Wang, J.Biol.Chem. 241 (1966) 2913.

99 R.S.Gilmour, J.Paul, J.Mol.Biol. 40 (1969) 137.

100 R.J.Krauze, A.J.MacGillivray, J.Paul, Biochem.J. 114 (1969) 40 P.

101 J.Sonnenbichler, P.Nobis, Hoppe Seyler.Z.Physiol.Chem. 349 (1968) 1556.

102 T.Y.Wang, E.W.Johns, Arch.Biochem.Biophys. 124 (1968) 176.

103 T.A.Langan, in "Regulatory Mechanisms in Nucleic Acid and Protein Biosynthesis" (von V.V.Koenigsberger und L. Bosch) Amsterdam, 1967, BBA Library Series, Elsevier, Bd.10, S.233 und 241.

104 C.S.Teng, C.T.Teng, V.G.Allfrey, J.Biol.Chem. 246 (1971) 3597.

105 G.Patel, V.Patel, T.Y.Wang. C.R.Zobel, Arch.Biochem.Biophys. 128 (1968) 654.

106 T.Y.Wang, J.Biol.Chem. 242 (1967) 1220.

107 W.J.Steele, H.Busch, Cancer Res. 23 (1963) 1153.

108 V.Holoubek, T.T.Crocker, Biochim.Biophys.Acta 157 (1968) 352.

109 B.Dastugue, J.Hanoune, J.Kruh, Fed.Eur.Biochem.Soc.Lett. 19 ((1971) 65.

110.G.Stein, R.Baserga, Biochem.Biophys.Res.Commun. 44 (1971) 218.

111 R.Hancock, J.Mol.Biol. 40 (1969) 457.

112 K.Marushige, D.Brutlag, J.Bonner, Biochemistry 7 (1968)3149.

113 J.Paul, R.S.Gilmour, J.Mol.Biol. 34 (1968) 305

114 C.W.Dingman, M.B.Sporn, J.Biol.Chem. 239 (1964) 3483.

115 T.Y.Wang, Exp.Cell Res. 53 (1968) 288.

116 T.C.Spelsberg, L.S.Hnilica, Biochim.Biophys.Acta 228 (1971) 202 und 212.

117 O.H.Lowry, N.J.Roserough, A.L.Farr, J.R.Randall, J.Biol. Chem. 193 (1951) 265.

118 K.Burton, Biochem.J. 63 (1956) 315.

119 M.Ogur, G.Rosen, Arch.Biochem. 25 (1950) 262.

120 G.R.Bartlett, J.Biol.Chem. 234 (1959) 466

121 F.Mohr, Ann.Chem.Pharm. 97 (1856) 335.

122 C.E.Sekeris, M.Beato, J.Homoki, L.F.Congote, Hoppe Seyler.Z.Physiol.Chem. 349 (1968) 857.

123 P.P.Dukes, C.E.Sekeris, W.Schmid, Biochim.Biophys.Acta 123 (1966) 126.

124 M.Beato, J.Homoki, C.E.Sekeris, Exp.Cell Res. 55 (1969) 107.

125 M.Beato, K.H.Seifart, C.E.Sekeris, Arch.Biochem.Biophys. 138 (1970) 272

126 C.R.McEwen, Anal.Biochem. 20 (1967) 114.

127 S.Katz. H.K.Schachmann, Biochim.Biophys.Acta 18 (1955) 28.

128 G.P.v.d.Schans, J.B.T.Aten, J.Blok, Anal.Biochem. 32 (1969) 14.

129 W.Bauer, J.Vinograd, J.Mol.Biol. 33 (1968) 141.

130 F.Sanger, Biochem.J. 39 ((1945) 507.

131 E.Stahl, "Dünnschichtchromatographie", Springer Verlag, Berlin,Göttingen,Heidelberg (1963).

132 A.L.Shapiro, E.Vinuela, J.V.Maizel, Biochem.Biophys. Res.Commun. 28 (1967) 815.

133 K.Weber, M.Osborn, J.Biol.Chem. 244 (1969) 4406.

134 D.Gallwitz, G.C.Mueller, J.Biol.Chem. 244 (1969) 5947.

135.P.J.Helmsing, H.D.Berendes, J.Cell Biol. 50 (1971) 893.

136 A.E.Mirsky, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 68 (1971) 2945.

137 P.Henson, J.O.Walker, Eur.J.Biochem. 14 (1970) 345.

138 J.F.Pardon, M.H.F.Wilkins, J.Mol.Biol. 68 (1972) 115.

139 W.Hennig, persönl.Mitteilg.

140 S.Olsnes, Eur.J.Biochem. 23 (1971) 248.

141 G.P.Georgiew, A.P.Ryskow, C.Coutelle, V.L.Mantieva, E.R. Avakyan, Biochim.Biophys.Acta 259 (1972) 259.

142.F.Crick, Nature 243 (1971) 25.

143 L.J.Kleinsmith, V.G.Allfrey, Biochim.Biophys.Acta 175 (1969) 123

144 L.A.Stocken, M.G.Ord, "The Cell Nucleus - Metabolism and Radiosensitivity", Tylor and Francis Ltd., London (1966) p.141.

145 M.G.Ord, L.A.Stocken, Biochem.J. 107 (1968) 403

146 J.H.Taylor, J.Cell Comp.Physiol. 62 (1963) 73.

147 J.A.Hubermann, A.D.Riggs, Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 55 (1966) 599.

148 E.Zimmermann, Angew.Chem. 84 (1972) 451.

149 T.Andeloh, T.Ide, Exp.Cell Res. 73 (1972) 122.

150 S.Bram, H.Ris, J.Mol.Biol. 55 (1971) 325.

151 R.S.Gilmour, J.Paul, Fed.Eur.Biochem.Soc.Lett. 9 (1970) 242.

152 J.Loeb, C.Creuzet, Fed.Eur.Biochem.Soc.Lett. 5 (1969) 37

153 B.Dastugue, L.Tichonicky, J.Penit-Soria, J.Kruh, Bull. Soc.Chim.Biol. 52 (1970) 391.

154 A.J.MacGillivray, D.Caroll, J.Paul, Fed.Eur.Biochem.Soc. Lett. 13 (1971) 204.

155 R.Howk, T.Y.Wang, Arch.Biochem.Biophys. 133 (1969) 238.

156 K.H.Seifart, C.E.Sekeris, Eur.J.Biochem.7 (1969) 408.

157 E.Schiltz, C.E.Sekeris, Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 350 (1969) 317.

158 D.Gallwitz, persönl.Mitteilg.

159 L.A.Racey, P.Byvoet, Exp.Cell Res. 64 (1971) 366.

160 C.E.Sekeris, K.E.Sekeri, D.Gallwitz, Hoppe Selyers Z. Physiol.Chem. 348 (1967) 1660.

161 E.Schiltz, C.E.Sekeris, Experientia 27 (1971) 30.

162 M.Takeda, H.Yamamura, Y.Ohga, Biochem.Biophys.Res.Commun. 42 (1971) 103.

163 D.Gallwitz, Fed.Eur.Biochem.Soc.Lett. 13 (1971) 306.

164 P.H.W.Butterworth, R.F.Cox, C.J.Chesterton, Eur.J.Biochem. 23 (1971) 229.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 23.9.1943 in Kleinmachnow bei Berlin als viertes von fünf Kindern von Hildegard Richter geb. Steinweg und Dr. Theodor Richter geboren. Im Jahr 1950 wurde ich in Doktorsdhünn bei Dabringhausen eingeschult. Das Abitur legte ich Anfang 1963 im Gymnasium für Jungen in Hamburg-Altona ab und begann dann das Studium der Biochemie in Tübingen.
Anfang des Jahres 1965 habe ich Gesa Hente geheiratet. Wir haben zwei Kinder im Alter von fünf und sieben Jahren.
Im Frühjahr 1970 schloß ich das Studium, nach Beendigung meiner Diplomarbeit: Versuche zur Anreicherung der γ-L-Glutamyl-L-Cystein: Glycin Ligase, mit dem Diplom ab.
Im April 1970 begann ich die Doktorarbeit im Physiologisch-Chemischen Institut der Philipps-Universität Marburg/Lahn.

MARBURG Oktober 1972